

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par Université de Montpellier

**Préparée au sein de l'école doctorale GAIA
Et des unités de recherche
CMAEE, Cirad et UVIP, Anses**

Spécialité : Microbiologie / Parasitologie

Présentée par Jennifer BERNARD

**Caractérisation de la compétence
vectorielle des tiques Ornithodores pour le
virus de la peste porcine africaine et étude
de deux déterminants: la relation souche
virale – vecteur et l'influence de la salive de
tiques sur l'infection chez le porc domestique.**

Soutenue le 15/12/2015 devant le jury composé de

Mme Sarah BONNET, Directeur de recherche	INRA-ANSES-ENVA	Rapportrice
Mr Frank KOENEN, Chercheur	CODA-CERVA	Rapporteur
Mme Karen McCOY, Directeur de recherche	CNRS-IDR	Examinatrice
Mr Gérard DUVALLET, Professeur émérite	UM3	Examineur
Mme Marie-Frédérique LE POTIER, Ingénieur de recherche hors classe	ANSES	Co-directrice
Mme Laurence VIAL, Chercheur	CIRAD	Invitée

L'influence du parasitisme sur l'évolution du vivant est pour certains un thème de recherche majeur et pour d'autres une option sans doute tôt ou tard incontournable sachant que tous les organismes vivants sont concernés par le parasitisme.

(Introduction du livre Écologie et évolution des systèmes parasités, Thomas, R., Guégan J-F., Renaud F.).

Remerciements

La fin de ce projet de thèse est pour moi la fin d'une jolie histoire riche en rebondissements. Je tiens à exprimer mes remerciements à tous ceux qui ont participé de près ou de loin, par un conseil ou un soutien, à construire et à réaliser ce projet.

Je souhaite particulièrement remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Je remercie également tous les membres de mes comités de thèse pour m'avoir permis de construire et d'orienter ce projet.

-Merci à Jérémy Bouyer, Emmanuel Albina, Laurence Vial et Marie-Frédérique Le Potier pour m'avoir permis d'intégrer ce projet et de m'y développer, ainsi qu'aux structures du Cirad et de l'Anses pour m'avoir donné les moyens de l'aboutir.

-Merci encore et encore, Marie-Frédérique, pour m'avoir fait confiance, m'avoir soutenue et m'avoir tant appris. J'ai pu construire ce projet grâce à ta réactivité et ton investissement. Merci de m'avoir toujours chaleureusement donné les moyens de réussir et de m'avoir encadrée judicieusement. Merci d'avoir répondu à mes questions et de m'avoir permis de grandir.

-Merci encore mille fois Laurence, j'ai vraiment beaucoup appris et mûri à tes côtés, merci de m'avoir laissé partager cette passion commune (de presque seulement nous deux, mais bon on arrivera peut-être à en convertir d'autres un jour...) pour les tiques. Merci d'avoir supporté mes innombrables questions et questionnements, de m'avoir tant conseillée et d'avoir toujours su m'encourager et m'encadrer, même de chez toi pendant ta grossesse.

-Merci à ceux qui ont marqué mes parcours scolaire et/ou parasito et fait découvrir ce monde si vaste et passionnant en particulier, Olivier Duron, Serge Morand, Arlette Dupond et au groupe TMT.

-Merci à toute l'équipe du CMAEE qui m'a accueillie la première fois et qui semblait toujours contente de me retrouver lors de mes escapades montpelliéraines. Merci aussi pour vos conseils et votre aide. Merci Vincent pour toute ton aide en virologie, pour m'avoir initiée à ce virus et d'avoir répondu à toutes mes « j'ai une question ». Merci Valérie pour ton aide précieuse en

immuno, merci à Philippe pour tes conseils précieux en histologie. Merci à Renaud pour ton aide immense en statistique. Merci aux entomo, Laetitia, Xavier, Ignace, pour tous les petits coups de main, à Claire et Thomas pour leurs conseils et pour avoir toujours eu un mot d'encouragement, Frédéric pour son aide en Géorgie et tous ses conseils sur les tiques, Karine pour son aide et pour m'avoir fait partager ses loisirs, vive la danse ! Merci aux secrétaires, Sylvie, Denise, Nadège et Lysiane pour leur patience et leur rapidité. Merci aux animaliers, Noël et Thierry. Merci à Olivier pour m'avoir supportée dans son bureau. Merci aussi, à Cécile, Virginie, Karine, Geneviève, Renata, François, Patricia, Séraphin, Lucia, Armel, Dominique, Philippe, Catherine, David pour leur soutien et leur bonne humeur.

-Merci à toutes les équipes de l'Anses, pour m'avoir accueillie si chaleureusement en Bretagne. Merci à la VIP pour leur bonne humeur et leur disponibilité. Merci pour vos conseils et votre aide précieuse. Merci à ma bonne Fée Evelyne, sans qui je n'aurai jamais pu faire autant de choses, merci pour ton enthousiasme, ta bonne humeur et tes conseils. Merci à Françoise pour avoir été une coloc de bureau formidable. Merci Mireille pour ton aide et ton réconfort. Merci à Gaëlle et Olivier pour toutes leurs remarques pertinentes et leurs conseils. Merci aussi à tous les autres, car vous m'avez tous aidée dans ce projet, Aurélie, Stéphane G, Stéphane Q, Nicolas, Sophie G, Sophie M, Céline, Séverine, Virginie, Kristell, Émilie. Un grand merci à Patricia pour m'avoir aidée et m'avoir fait rencontrer des personnes que je n'oublierai pas.

-Au SPPAE pour leur réactivité et leur aide immense en animalerie, et aux nombreuses heures de discussion en slip... Merci donc Frédéric, Audrey, Jean-Marie, André, Yann, Angélique, Gérald et Nadège.

-Merci aux Montpelliérains et aux Bretons et Bretons de cœur pour m'avoir intégrée parmi vous et pour votre amitié.

- Sans oublier bien sûr merci à mes tiques Chouchoux et aux petits porcs tout mimis qui m'ont rendue de grands services.

Merci enfin à

- Dr Drey, ton soutien et ton amitié représentent tellement pour moi. Enfin fini...on va pouvoir faire la fête avec ces nouveaux super pouvoirs ! Et non, tu ne me feras pas changer d'avis, les tiques c'est cool !

-Merci à Marc, merci pour le réconfort, les joies, la patience, la complicité, les avis, et les millions de lecture et de corrections orthographiques que tu as faites.

-Merci à ma famille sans qui je n'aurais pas pu être ici. Merci de m'avoir poussée toujours plus loin et d'avoir cru en moi. Papi, Mamie, Papa, Maman, Aurélien, je vous aime fort ! Votre soutien quotidien est quelque chose d'extrêmement précieux. Un petit clin d'œil en plus à ma maman chérie qui s'est aussi beaucoup investi dans la relecture de ce manuscrit... mine de rien je m'améliore en orthographe...

Table des Matières

REMERCIEMENTS	- 2 -
TABLE DES MATIERES	- 5 -
ABBREVIATIONS.....	- 13 -
INTRODUCTION :	- 15 -
I. INTRODUCTION GENERALE	- 15 -
II. LE MODELE D'ETUDE ET LES OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	- 24 -
III. PRESENTATION DE LA PESTE PORCINE AFRICAINE ET DE CE QUI EST CONNU DE L'IMPLICATION DES TIQUES VECTRICES <i>ORNITHODOROS</i>	- 25 -
A. Historique et répartition actuelle.	- 25 -
B. Pathologie et impacts de la maladie	- 27 -
C. L'agent étiologique : le virus de la peste porcine africaine.....	- 28 -
D. Cycle épidémiologique.....	- 32 -
1. Cycle selvatique	- 32 -
2. Cycle intermédiaire.....	- 34 -
3. Cycle domestique.....	- 34 -
E. Le vecteur.....	- 35 -
1. Les vecteurs suspectés :	- 35 -
2. Les vecteurs et réservoirs avérés : les tiques du genre <i>Ornithodoros</i>	- 36 -
* Les espèces impliquées dans la transmission du virus de la PPA.....	- 36 -
* Confusion taxonomique et complexe d'espèces	- 37 -
* Écologie	- 38 -
* Cycle de vie	- 39 -
F. Pourquoi la compétence vectorielle des tiques <i>Ornithodoros</i> ?	- 42 -
CHAPITRE 1 : CARACTERISATION DE LA COMPETENCE VECTORIELLE DES TIQUES DU GENRE <i>ORNITHODOROS</i> POUR LE VIRUS DE LA PESTE PORCINE AFRICAINE	- 43 -
I. CAPACITE VECTORIELLE <i>VERSUS</i> COMPETENCE VECTORIELLE	- 44 -
II. MATERIEL ET METHODES POUR L'ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	- 47 -
A. Stratégie de recherche des ressources bibliographiques	- 47 -
B. Critères de sélection des ressources de références.....	- 47 -
C. Évaluation de la qualité des ressources et des risques de biais.....	- 48 -
D. Données méthodologiques issues des ressources bibliographiques de références	- 50 -
E. Données de compétences issues des ressources bibliographiques de référence	- 51 -
F. Analyse synthétique des données de compétence.....	- 52 -
III. RESULTATS D'ANALYSE DES ARTICLES DE REFERENCE SUR LA COMPETENCE VECTORIELLE DES TIQUES <i>ORNITHODOROS</i> POUR LE VIRUS DE LA PPA.....	- 53 -
A. Sélection et typologie des articles de référence	- 53 -
B. Données méthodologiques	- 54 -
1. Espèces de tiques et souches virales testées	- 54 -
* Les tiques <i>Ornithodoros</i> :	- 54 -
* Souche de virus de la PPA :	- 59 -
* Couple tique-virus étudié	- 59 -
	- 5 -

2.	Méthodologie d'infection des tiques et de suivi	- 60 -
3.	Mesures de compétence vectorielle utilisées par les auteurs	- 64 -
*	Mesure de la persistance du virus de la PPA dans les tiques.....	- 64 -
*	Mesure de la transmission horizontale du virus de la PPA par les tiques lors de repas de sang	- 65 -
*	Mesure de la transmission transtadiale du virus de la PPA dans les tiques.....	- 66 -
*	Mesure de la transmission sexuelle du virus de la PPA par les tiques.....	- 66 -
*	Mesure de la transmission transovarienne du virus de la PPA par les tiques.....	- 67 -
C.	Patrons généraux de la compétence vectorielle des tiques <i>Ornithodoros</i> pour le virus de la PPA.....	- 68 -
D.	Dynamique du virus dans les tiques	- 68 -
1.	Entrée et dissémination du virus dans la tique	- 68 -
2.	Multiplication virale et cinétique du virus dans les tiques	- 71 -
3.	Pathogénicité du virus chez la tique	- 75 -
E.	Transmission du virus par les tiques	- 76 -
1.	La transmission horizontale par les tiques aux suidés	- 77 -
*	Sécrétion de fluide coxal ou liquide coxal.....	- 77 -
*	Sécrétion de salive	- 78 -
	Excrétion de fèces.....	- 80 -
	Résultats de transmission par les tiques aux suidés.....	- 80 -
2.	Les modes de transmission entre tiques.....	- 82 -
*	Transmission transtadiale	- 82 -
*	Transmission sexuelle (ou vénérienne)	- 83 -
*	Transmission transovarienne (ou filiale).....	- 84 -
F.	Scénarios synthétiques de compétence vectorielle.....	- 87 -
IV.	DISCUSSION DU CHAPITRE 1	- 90 -
A.	Sélection des articles de références	- 90 -
B.	Définition commune de la compétence vectorielle et de ces mesures	- 91 -
C.	Diversité des patrons de compétence vectorielle et identification des facteurs clés.	- 95 -
D.	Diversité et limite des méthodologies évaluant la compétence vectorielle	- 98 -
V.	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES DU CHAPITRE 1	- 101 -

CHAPITRE 2 : ÉVALUATION DE LA COMPÉTENCE VECTORIELLE DE TROIS ESPÈCES DE TIQUES *ORNITHODOROS* POUR DEUX SOUCHES DU VIRUS DE LA PPA DE GENOTYPE II. - 104 -

I.	INTRODUCTION	- 104 -
II.	MATÉRIEL ET MÉTHODES	- 106 -
A.	Matériel biologique.....	- 106 -
1.	Souches virales.....	- 106 -
2.	Tiques <i>Ornithodoros spp</i>	- 107 -
3.	Porcs domestiques.....	- 109 -
B.	Infection des tiques par deux méthodes de gorgement	- 110 -
1.	Infection des tiques par gorgement artificiel.	- 110 -
2.	Infection des tiques par gorgement sur porc infecté	- 111 -
*	Mise au point des gorgements sur porc	- 111 -
*	Gorgement des tiques sur porcs infectés	- 115 -
C.	Expérience de transmission du virus par les tiques aux porcs sains	- 115 -
D.	Méthode de détection/quantification du virus chez la tique	- 117 -
1.	Par isolement viral	- 117 -
2.	Par PCR temps réel.....	- 118 -

E.	Calendrier de disponibilité des tiques et planning des expérimentations.....	- 121 -
III.	RESULTATS	- 121 -
A.	Résultats d'infection des tiques	- 121 -
B.	Transmission	- 125 -
1.	Détection du virus sur les moustiquaires de contact tiques – porc.	- 125 -
2.	Résultats du suivi des porcs	- 125 -
*	Suivi clinique et température	- 125 -
*	Examen post mortem	- 128 -
*	Détection virale dans les organes et le sang.....	- 130 -
IV.	DISCUSSION DU CHAPITRE 2	- 131 -
A.	Infection des tiques.....	- 131 -
B.	Transmission vectorielle au porc	- 133 -
C.	Limites et perspectives	- 135 -
CHAPITRE 3 : ROLE DE LA SALIVE DE TIQUE <i>ORNITHODOROS</i> DANS LA TRANSMISSION D'UN VIRUS DE GENOTYPE II AU PORC.....		- 138 -
I.	SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	- 139 -
A.	La salive des arthropodes hématophages, un puissant immunomodulateur.....	- 139 -
1.	Aperçu de la première étape de la réponse de l'hôte vertébré face à une blessure : l'hémostase.....	- 139 -
2.	Aperçu de la seconde étape de la réponse de l'hôte vertébré face à une blessure : inflammation et système immunitaire inné.....	- 142 -
B.	La salive des arthropodes hématophages améliore la transmission des parasites.	- 149 -
II.	PARTIE EXPERIMENTALE : INFLUENCE DE LA SALIVE DES TIQUES <i>O. PORCINUS</i> SUR L'INFECTION DU PORC PAR LE VIRUS DE LA PPA.....	- 151 -
III.	MATERIELS ET METHODES.....	- 152 -
A.	Matériel biologique utilisé.	- 152 -
B.	Plan de l'essai et suivi des porcs	- 152 -
C.	Analyse des prélèvements	- 153 -
D.	Utilisation des tiques et préparation des glandes salivaires des tiques <i>Ornithodoros porcinus</i> ..	- 154 -
E.	Études immuno-histologiques	- 155 -
1.	Préparation des coupes histologiques d'oreille	- 155 -
*	Prélèvement des biopsies.....	- 155 -
*	Cryosection	- 157 -
*	Marquage par immunofluorescence indirecte des lames	- 159 -
*	Coloration des lames	- 161 -
2.	Analyse d'images	- 161 -
*	Prise de photographies	- 161 -
*	Soustraction de l'autofluorescence	- 162 -
*	Réalisation de panoramas et comptage des cellules	- 163 -
F.	Analyses statistiques et exploitation des résultats	- 166 -
IV.	RESULTATS	- 169 -
A.	La réponse immune générale du porc : signes cliniques et physiopathologie.....	- 169 -
1.	Scores cliniques et virémie.....	- 169 -
2.	Numération formule sanguine	- 170 -
3.	Dosage de cytokines	- 172 -
4.	Lésions macroscopiques	- 174 -

B.	Résultats de l'effet des SGE de tique sur l'infection locale.	- 176 -
1.	Détection du virus dans les organes et plus particulièrement les ganglions parotidiens	- 176 -
2.	Étendue des lésions cutanées	- 179 -
3.	Mastocytes de la peau	- 181 -
4.	Cellules myéloïdes de la peau	- 183 -
5.	Densité des cellules de Langerhans	- 184 -
6.	Recrutement macrophagique	- 187 -
7.	Détection du virus	- 191 -
V.	DISCUSSION DU CHAPITRE 3	- 193 -
A.	Effet de la dose virale sur le délai de mise en place de la réponse immunologique et symptomatique du porc	- 194 -
B.	La présence de SGE module la réponse immune du porc.....	- 195 -
1.	Les SGE seuls ne modulent pas les réponses physiologiques ni immunologiques générales du porc	- 195 -
2.	Les SGE en présence de virus amplifient la fièvre.....	- 195 -
3.	Les SGE ont un effet immunomodulateur sur les lésions tissulaires de la peau	- 195 -
4.	Les SGE favorisent la disparition des LC dans l'épiderme	- 197 -
5.	Les SGE favorisent le recrutement des macrophages dans le derme	- 198 -
6.	Les SGE retardent l'infection virale dans le premier ganglion drainant	- 199 -
C.	Scénarios d'infection et perspectives	- 200 -
	CONCLUSION GENERALE	- 203 -
	ANNEXES.....	- 206 -
	ANNEXE 1 : GRAPHIQUES DES DONNEES DE CINETIQUES SUR 182 JOURS DE DIFFERENTES SOUCHES DE VIRUS DANS DIFFERENTES ESPECES DE TIQUE RAPPORTEES DANS LES PUBLICATIONS TRAITANT DE COMPETENCE VECTORIELLE.	- 206 -
	ANNEXE 2 : RECAPITULATIF DES DONNEES METHODOLOGIQUES DES ETUDES SUR LA COMPETENCE VECTORIELLE.....	- 208 -
	ANNEXE 3 : RENDU DES AVIS FAVORABLES DES SAISINES AUPRES DU COMITE D'ETHIQUE N°12-091 ET N°15-020	- 212 -
	ANNEXE 4 : EXEMPLES DE FICHE DE SUIVI CLINIQUE DES ANIMAUX LORS DES ESSAIS EXPERIMENTAUX	- 214 -
	ANNEXE 5 : FICHE D'AUTOPSIE DES ESSAIS AVEC LE VIRUS DE LA PPA A COMPLETER LORS D'EXAMENS POST-MOTEM.....	- 215 -
	ANNEXE 6 : DESCRIPTION DE LA CASCADE DE COAGULATION ET DU SYSTEME DU COMPLEMENT DES VERTEBRES.....	- 216 -
	ANNEXE 7 : ARTICLES.....	- 218 -
A.	Effect of <i>O. porcinus</i> tick salivary gland extract on the African swine fever virus infection in domestic pig.....	- 218 -
B.	Vector competence of Ornithodoros ticks for African swine fever virus: a systematic review of published evaluations.....	- 219 -
	ANNEXE 8 : VALORISATIONS ORALES ET POSTERS	- 220 -
	BIBLIOGRAPHIE	- 229 -

FIGURE 1 : DIFFERENTES MODALITES DE TRANSMISSION DES PARASITES.....	18 -
FIGURE 2 : SEQUENCE DE DEFENSE D'UN HOTE FACE A UN PARASITE.....	21 -
FIGURE 3 : COOPERATION ENTRE LES REPONSES IMMUNITAIRES INNEE ET ADAPTATIVE POUR COMBATTRE UNE INFECTION.	23 -
FIGURE 4 : DISTRIBUTION DE LA PESTE PORCINE AFRICAINE EN AFRIQUE.....	26 -
FIGURE 5 : CARTE DE DISTRIBUTION DES DECLARATIONS DE CAS DE LA PPA ENTRE JANVIER ET JUIN 2015 CHEZ LES SUIDES SAUVAGES ET DOMESTIQUES.	26 -
FIGURE 6 : CYCLE REPLICATIF DU VIRUS DE LA PPA.	30 -
FIGURE 7 : CYCLES EPIDEMIOLOGIQUES DU VIRUS.	33 -
FIGURE 8 : CARTE DE REPARTITION D'UNE PARTIE DES TIQUES <i>ORNITHODOROS</i> AFRICAINES, EUROPEENNES, ORIENTALES ET ASIATIQUES. (VIAL, 2009).	38 -
FIGURE 9 : TAILLE MOYENNE DES DIFFERENTS STADES DES TIQUES <i>O. PORCINUS</i>	41 -
FIGURE 10 : ORGANES SEXUELS DES TIQUES <i>O. MOUBATA</i> , MALE A GAUCHE ET FEMELLE A DROITE (J. BERNARD).....	41 -
FIGURE 11 : SCHEMA REPRESENTANT LES INTERACTIONS EXISTANTES ENTRE LES DIFFERENTS PROTAGONISTES LORS D'UNE TRANSMISSION VECTORIELLE.	45 -
FIGURE 12 : ORGANIGRAMME DE LA SELECTION DES RESSOURCES BIBLIOGRAPHIQUES DE REFERENCE.....	48 -
FIGURE 13: REPARTITION DANS LE TEMPS DES 32 ARTICLES DE REFERENCE (LIGNE NOIRE) ET DES 140 PUBLICATIONS RECOLTEES D'APRES LES MOTS CLES « TIQUE » ET « ASFV » (LIGNE GRISE).	56 -
FIGURE 14 : SCHEMA ANATOMIQUE D'UNE TIQUE <i>ORNITHODOROS</i> REPRESENTANT LES PRINCIPAUX ORGANES ET ETAPES D'INFECTION PAR LE VIRUS DE LA PPA.	69 -
FIGURE 15 : COURBES DE TENDANCE DES CINETIQUES DE MULTIPLICATION VIRALE POUR DIFFERENTES SOUCHES DE VIRUS DE LA PPA (UNE COURBE PAR SOUCHE) DANS DIFFERENTES ESPECES DE TIQUES (UN GRAPHIQUE PAR ESPECE) SUR 182 JPI.	74 -
FIGURE 16 : PHOTOGRAPHIE D'UNE TIQUE <i>O. MOUBATA</i> FEMELLE EN TRAIN DE SECRETER DU LIQUIDE COXAL (J. BERNARD).....	78 -
FIGURE 17 : SCENARIOS DE COMPETENCE VECTORIELLE DE CHAQUE COUPLE DE TIQUES <i>ORNITHODOROS</i> – SOUCHE DE VIRUS DE LA PPA ETUDIEES DANS LES 32 ARTICLES DE REFERENCE.....	89 -
FIGURE 18: MATERIEL UTILISE POUR MAINTENIR LES TIQUES MOLLES EN ELEVEGE.	109 -
FIGURE 19: DISPOSITIF DE GORGEMENT DES TIQUES SUR MEMBRANE ARTIFICIELLE SUR PLAQUE A PUIITS.....	111 -
FIGURE 20: PHOTOGRAPHIES REPRESENTANT LES DISPOSITIFS DE POSE DES TIQUES SUR LES PORCS.	112 -
FIGURE 21: PHOTOGRAPHIES DES EFFETS DES DISPOSITIFS DE GORGEMENT 2H APRES LA POSE LORS DE LA PREMIERE PARTIE DE L'ESSAI SANS PRESENCE DE TIQUE.	112 -
FIGURE 22 : PHOTOGRAPHIES DE LA SECONDE PARTIE DE L'ESSAI AVEC LA PRESENCE DE TIQUES.....	114 -
FIGURE 23 : BOITE DE PETRI UTILISEE LORS DE GORGEMENT DES TIQUES SUR PORC VIGIL.	114 -
FIGURE 24 : OBSERVATION DE MACROPHAGES ALVEOLAIRES PORCINS INFECTES PAR LE VIRUS DE LA PPA (OBJECTIF X10).	118 -
FIGURE 25 : GRAPHIQUE REPRESENTANT LES RESULTATS (Ct) DE PCR TEMPS REEL SUR DES DILUTIONS EN SERIE AVEC OU SANS AJOUT D'UN SURNAGEANT DE TIQUES.	119 -
FIGURE 26: RESULTATS DE LA DETECTION DU GENOME VIRAL PAR PCR EN TEMPS REEL DANS UN BROYAT DE TIQUES ENTIERES.	124 -
FIGURE 27: GRAPHIQUE DES MOYENNES PAR GROUPE DE PORCS ET PAR JOUR, DES TEMPERATURES RECTALES DES PORCS DES ESSAIS DE TRANSMISSION.	127 -
FIGURE 28 : SCHEMA DE L'ACTION DES MOLECULES DE LA SALIVE DE PLUSIEURS FAMILLES D'ARTHROPODES HEMATOPHAGES LORS DE L'HEMOSTASE.....	141 -
FIGURE 29 : SCHEMA DE L'ACTION DES MOLECULES DE LA SALIVE DE PLUSIEURS FAMILLES D'ARTHROPODES HEMATOPHAGES LORS DE LA MODULATION DE L'IMMUNITE INNEE ET ADAPTATIVE.....	144 -
FIGURE 30 : SCHEMA DU COMPORTEMENT DES LYMPHOCYTES B ET T DANS UN GANGLION LYMPHATIQUE APRES INTRODUCTION D'UN ANTIGENE.	147 -

FIGURE 31 : SCHEMA NON EXHAUSTIF REPRESENTANT LE RESEAU DE CYTOKINES EVOQUE DANS CE CHAPITRE CONTROLANT LE SYSTEME IMMUNITAIRE.....	- 147 -
FIGURE 32 : REPRESENTATION DU PROTOCOLE DE DISSECTION SUR UNE FEMELLE <i>O. PORCINUS</i>	- 155 -
FIGURE 33 : PHOTOGRAPHIE D'OREILLES DE PORC PRELEVEES 1H APRES L'INOCULATION.....	- 157 -
FIGURE 34 : CRYOCOUCPE DE BIOPSIES DE PEAU DE PORC.....	- 158 -
FIGURE 35 : SELECTION DES ANTICORPS PRIMAIRES POUR ETUDIER LES MACROPHAGES ET LES CELLULES DE LANGERHANS.	- 160 -
FIGURE 36 : EXEMPLE DE L'INTERET DE LA SOUSTRACTION D'AUTOFLUORESCENCE D'APRES UN MONOMARQUAGE A-SWC3/ALEXA 568.....	- 163 -
FIGURE 37 : BIOPSIES DE PEAU D'OREILLE DE PORCS MARQUEES PAR IMMUNOFLUORESCENCE PAR LES ANTICORPS A-SWC3 ET A-CD163.	- 165 -
FIGURE 38: METHODE DE COMPTAGE DES CELLULES DANS L'EPIDERME DES BIOPSIES DE PEAU D'OREILLE TRAITEES.....	- 165 -
FIGURE 39 : SCORES CLINIQUES, VIREMIE ET VARIATION DES TEMPERATURES RECTALES.	- 170 -
FIGURE 40 : NUMERATION DES LEUCOCYTES SANGUINS PAR GROUPE DE PORCS.....	- 172 -
FIGURE 41 : DOSAGE SERIQUE DE CYTOKINES : DOSAGE DU TNF-A, DE L'INF-A, DE L'IL-6 ET DE L'IL-12.....	- 173 -
FIGURE 42 : COUPE HISTOLOGIQUE DE GANGLION PAROTIDIEN DU COTE DE L'INOCULATION A 48H PI.	- 177 -
FIGURE 43 : DETECTION VIRALE DANS LES GANGLIONS LYMPHATIQUES PAROTIDIENS A 48 HPI.	- 178 -
FIGURE 44 : DETECTION DE L'ADN VIRAL PAR PCR EN TEMPS REEL DANS LA RATE ET LES AMYGDALES DES PORCS INOCULES AVEC DU VIRUS.....	- 178 -
FIGURE 45 COUPE HISTOLOGIQUE DE PEAU MORDUE PAR UNE TIQUE.	- 180 -
FIGURE 46 : COUPE DE PEAU D'OREILLE DE PORC PRESENTANT DES MASTOCYTES.	- 182 -
FIGURE 47 : DENSITE DE MASTOCYTES COMPTABILISES SUR TOUTE LA SURFACE DES BIOPSIES A 1H ET 48 HPI.....	- 182 -
FIGURE 48 : COUPE HISTOLOGIQUE DE LA BIOPSIE D'INOCULATION INTRADERMIQUE D'UN PORC DU GROUPE ID ASFV + SGE DE L'ESSAI LD MARQUEE PAR UN ANTICORPS A-CD14.	- 183 -
FIGURE 49 : CLASSIFICATION DES BIOPSIES PAR DIFFERENCES DE DENSITE DES CELLULES DE LANGERHANS ASSOCIEES AU MODELE DE LESIONS HISTOLOGIQUES.	- 185 -
FIGURE 50 : PATRON DE LA DIFFERENCE DE DENSITE DES LC ENTRE L'OREILLE INOCULEE ET L'OREILLE OPPOSEE.	- 186 -
FIGURE 51 : BIOPSIES DE PEAU DE PORC MORDU PAR UNE TIQUE A 48 HPI.....	- 186 -
FIGURE 52 : MOYENNE DE LA DENSITE DE MACROPHAGES DANS LES RECTANGLES DU DERME ET DU DERME PROFOND SUR LA TOTALITE DES GROUPES DE PORCS.	- 188 -
FIGURE 53 : MOYENNE DE LA DENSITE DE MACROPHAGES DES RECTANGLES PAR GROUPES DE PORCS.	- 188 -
FIGURE 54 : BIOPSIES DE PEAU DE PORC MORDU PAR UNE TIQUE A 1H PI MARQUEES.	- 189 -
FIGURE 55 : EFFET DE LA MORSURE DE TIQUE ET DE L'INOCULATION A 1H SUR L'OREILLE DE PORC.....	- 189 -
FIGURE 56 : DIFFERENCE DE DENSITE MACROPHAGIQUE ENTRE L'OREILLE INOCULEE ET L'OREILLE OPPOSEE.....	- 190 -
FIGURE 57 : MOYENNE DE DENSITE DE CELLULES INFECTEES PAR LE VIRUS DE LA PPA DANS LES BIOPSIES D'OREILLES DES PORCS DE L'ESSAI HAUTE DOSE A 48H PI.	- 191 -
FIGURE 58 : BIOPSIES DE PEAU D'OREILLE D'UN PORC ID ASFV + SGE DE L'ESSAI HD A 48H PI.	- 192 -

TABLEAU 1 : EXEMPLES DE CONDITIONS DE VIE DE DIFFERENTES ESPECES DE TIQUES <i>ORNITHODOROS</i> .	- 39 -
TABLEAU 2 : LISTE DES 32 ARTICLES DE REFERENCE SELECTIONNES POUR LEURS DONNEES ORIGINALES SUR LA COMPETENCE VECTORIELLE DES TIQUES <i>ORNITHODORES</i> POUR LE VIRUS DE LA PPA.	- 55 -
TABLEAU 3 : PRESENTATION DES ESPECES DE TIQUES ET DES SOUCHES DE VIRUS ETUDIEES DANS LES 32 ARTICLES DE REFERENCE.	- 58 -
TABLEAU 4 : METHODOLOGIES UTILISEES DANS LES 32 ARTICLES DE REFERENCES POUR L'INFECTION ET LE SUIVI DES TIQUES <i>ORNITHODOROS</i> PAR LE VIRUS DE LA PPA.	- 63 -
TABLEAU 5 : TECHNIQUES UTILISEES PAR 29 DES 32 ARTICLES DE REFERENCE POUR LA DETECTION DU VIRUS DE LA PPA ET/OU SA QUANTIFICATION DANS LES TIQUES.	- 64 -
TABLEAU 6 : RECAPITULATIF DES MESURES DE COMPETENCE VECTORIELLE UTILISEES DANS LES 32 ARTICLES DE REFERENCE, CLASSEES PAR ORDRE DECROISSANT DU NOMBRE DE COUPLES TIQUE-VIRUS ETUDIES POUR CHAQUE MESURE.	- 68 -
TABLEAU 7 : TABLEAU RECAPITULATIF DES DONNEES DE MORTALITE DE TIQUES INFECTEES PAR LE VIRUS DE LA PPA DISPONIBLES DANS LA LITTERATURE DE REFERENCE.	- 76 -
TABLEAU 8: TABLEAU RECAPITULATIF DES PUBLICATIONS OU LA TRANSMISSION HORIZONTALE (TH) DU VIRUS AUX PORCS PAR LES TIQUES <i>ORNITHODOROS</i> A ETE TESTEE.	- 81 -
TABLEAU 9 : TABLEAU RECAPITULATIF DES PUBLICATIONS OU LA TRANSMISSION TRANSTADIALE A ETE ETUDIEE.	- 83 -
TABLEAU 10 : TABLEAU RECAPITULATIF DES ETUDES SUR LA TRANSMISSION SEXUELLE.	- 84 -
TABLEAU 11 : TABLEAU RECAPITULATIF DES PUBLICATIONS DE REFERENCE ETUDIANT LA TRANSMISSION TRANSOVARIEENNE DU VIRUS DE LA PPA PAR LES TIQUES <i>ORNITHODOROS</i> .	- 86 -
TABLEAU 12 : TABLEAU DES SCENARIOS DE COMPETENCE VECTORIELLE DES TIQUES <i>ORNITHODOROS</i> POUR LE VIRUS DE LA PPA.	- 88 -
TABLEAU 13: RECAPITULATIF DES COUPLES DE TIQUE-VIRUS GORGEES PAR GORGEMENT ARTIFICIEL SUR MEMBRANE DE PARAFILM®	- 111 -
TABLEAU 14 : DEROULEMENT ET RESULTATS DE LA PREMIERE PARTIE DE L'ESSAI, SANS PRESENCE DE TIQUE DES DIFFERENTS DISPOSITIFS DE POSE DES TIQUES.	- 112 -
TABLEAU 15 : RESULTATS DE LA SECONDE PARTIE DE L'ESSAI AVEC LA PRESENCE DE TIQUES DISPOSEES SUR L'OREILLE OU SUR LA NUQUE SUR 6 PORCS.	- 114 -
TABLEAU 16: RECAPITULATIF DES TIQUES GORGEES SUR SANG INFECTEES PAR GORGEMENT NATUREL SUR PORCS VIREMIQUES.	- 115 -
TABLEAU 17: RECAPITULATIF DES ESSAIS DE TRANSMISSION REALISES A PARTIR DE TIQUES GORGEES SUR SANG INFECTE PAR MEMBRANE ARTIFICIELLE OU SUR PORC VIREMIQUE.	- 116 -
TABLEAU 18: RECAPITULATIF DES GROUPES DE PORCS TEMOINS UTILISES POUR LES ESSAIS DE TRANSMISSION DU VIRUS PAR LES TIQUES.	- 116 -
TABLEAU 19 : EXEMPLE DE QUANTITE DE SANG ABSORBE PAR DES TIQUES ADULTES LORS D'UN REPAS SUR SANG SAIN PAR GORGEMENT ARTIFICIEL SUR MEMBRANE DES TROIS ESPECES DE TIQUES <i>O. MOUBATA</i> , <i>O. PORCINUS</i> ET <i>O. ERRATICUS</i> .	- 120 -
TABLEAU 20: RECAPITULATIF DES RESULTATS DE DETECTION VIRALE PAR PCR TEMPS REEL DES TIQUES GORGEES SUR SANG INFECTE.	- 123 -
TABLEAU 21: RESULTATS DE LA DETECTION DU VIRUS PAR PCR EN TEMPS REEL ET PAR TITRAGE DES <i>O. ERRATICUS</i> GORGEES SUR PORC VIREMIQUE GEORGIA/2007/1.	- 124 -
TABLEAU 22 : SCORE DES ORGANES EN FONCTION DE L'INTENSITE DES LESIONS APRES UN EXAMEN POST-MORTEM DES ANIMAUX.	- 128 -
TABLEAU 23: LOCALISATION DES LESIONS POST-MORTEM PAR GROUPE DE PORCS (MOYENNE ET LES ECARTS-TYPE DES SCORES).	- 129 -
TABLEAU 24: TABLEAU DES RESULTATS DE DETECTION DU GENOME VIRAL DANS LES ORGANES ET LE SANG DU DERNIER JOUR DES EXPERIENCES.	- 130 -
TABLEAU 25 : NOMBRE DE PORCS PAR ESSAI, GROUPE DE TRAITEMENT (SALIVE DE TIQUE ET VIRUS DE LA PPA) ET PERIODE POST INOCULATION. Nb : NOMBRE DE PORC VIVANT A 1 – 48H ET 5-8 JOURS POST INOCULATION ; HPI : HEURES POST-INOCULATION ; JPI : JOURS POST-INOCULATION	- 153 -

TABLEAU 26 : TABLEAU RECAPITULATIF DES ANTICORPS PRIMAIRES TESTES.....	- 160 -
TABLEAU 27 : TABLEAU RECAPITULATIF DU NOMBRE DE BIOPSIES REALISEES PAR TRAITEMENT ET NOMBRE DE PANORAMAS RECONSTITUES PROVENANT DE 32 PORCS.....	- 164 -
TABLEAU 28 : CINETIQUE DU COMPTAGE MOYEN DE LEUCOCYTES SANGUINS ($\times 10^6$ CELLULES/ML DE SANG) SELON L'HYPERTHERMIE.....	- 171 -
TABLEAU 29 : LOCALISATION DES LESIONS OBSERVEES POST-MORTEM PAR GROUPE DE PORCS.	- 175 -

ABBREVIATIONS

5-HT	Sérotonine
Ad	Stade adulte de tique
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADP	Adénosine DiPhosphate
Anses	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ASFV LD	Groupe ayant reçu une faible dose de PPA
ASFV HD	Groupe ayant reçu une forte dose de PPA
CCID50	Cell Culture Infectious Dose 50%
CD	Cluster de Différenciation
Cellules NK	Cellules Natural Killer
CG	Cycle Gonotrophique
Cirad	Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigènes
Ct	Threshold cycle, cycle à partir duquel l'amplicon est détectable.
DAPI	4',6'-diamidino-2-phénylindole
DC	Cellules Dendritiques
DCi	Cellules Dendritiques interdigitalisées
ECP	Effet Cythopathogène
EDTA	Éthylène Diamine Tétra-Acétique
EOPS	Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiés
GA	Autres Ganglions
GFP-FITC	Green Fluorescent Protein - Fluorescein isothiocyanate
GHS	Ganglion Hépatostomacal
GPI	Ganglion Parotidien du côté à l'Inoculation ou la pose de tiques
GPO	Ganglion Parotidien du côté Opposé à l'inoculation ou la pose de tiques
H2P2	Plate-forme d'HistoPathologie Haute Précision de Rennes
HAD	Pouvoir hémasorbant
HD	Essai haute dose
HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HMWK	High-Molecular-Weight Kininogen : Protéine de type Kininogène
ICAM	InterCellular Adhesion Molecule
ID ASFV	Groupe de porcs ayant reçus une inoculation intradermique du virus de la PPA seul
ID ASFV + SGE	Groupe de porcs ayant reçus une inoculation intradermique de virus de la PPA ainsi que de l'extrait de glandes salivaires
ID SGE	Groupe de porcs ayant reçu une inoculation intradermique d'Extrait de Glande Salivaire seul
IFN	Interféron
IL	Interleukine
Jpi	Jour post-infection ou Jour post-gorgement infectieux (pour les tiques)

Kb	kilobase
LB	Lymphocyte B
LC	Cellules de Langerhans
LD	Essai faible dose
LT	Lymphocyte T
Lv	Stade larvaire des tiques
MEM	Milieu de culture Minimum Essential Medium
MGF	Multigenic Family
Nbr	Nombre
Ny1, Ny2, ...	Stade de nymphe 1, 2, etc.
OIE	Organisation mondiale de la santé animale
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PARS	Protease-Activated Receptors
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction, Amplification en chaîne par polymérase
PFA	Paraformaldéhyde
pi	Post infection
PK	PréKallikréine
PLI	Ganglion parotidien du coté de l'inoculation (parotid lymphnode inoculation side)
PLO	Ganglion parotidien du coté opposé (parotid lymphnode opposite side)
PMN	Polymorphonucléaire
PPA	Peste Porcine Africaine
PRR	Pattern Recognition Receptor
Ref	Référence
RHOD/CY3	Rhodamine, cyanine 3
SAT	Salive Activated Transmission
SGE	Salivary Gland Extract, Extrait de Glande Salivaire
TNF-α	Tumor Necrosis Factor type α
TCR	T Cell Receptor
SEM	Erreur Standard à la Moyenne
TH	Transmission Horizontale
TICK	Groupe de porcs ayant reçus un gorgement de tiques non infectées
TLR	Toll Like Receptor
TOT	Transmission Trans-Ovarienne
TS	Transmission Sexuelle
TST	Transmission Transtadiale

Introduction :

I. Introduction générale

La finalité biologique d'un organisme vivant est de transmettre ses gènes. Or, pour réaliser cette transmission, l'organisme vivant a besoin d'une source d'énergie adaptée. Excepté les organismes autotrophes qui sont capables de puiser leur énergie dans une matière inorganique, tous les autres vont devoir à un moment de leur existence interagir avec un autre organisme vivant pour obtenir cette énergie et transmettre ses gènes. Les interactions biologiques mises en place vont avoir pour conséquence des échanges réciproques entre les intervenants. Ainsi se décline un panel presque infini de possibilités d'interaction où chaque organisme va essayer de tirer un maximum de profits de son environnement, tout en se protégeant le plus possible des interactions néfastes de ce même environnement. Les enjeux et les pressions sont tels que sur le long terme seuls les organismes les mieux adaptés à leur environnement seront capables de transmettre leurs gènes, ils auront une meilleure valeur sélective.

L'observation et l'étude des mécanismes régissant les interactions entre les organismes sont véritablement complexes puisqu'ils font intervenir diverses échelles et domaines d'étude. En effet, à l'échelle de l'individu, un organisme peut expérimenter des interactions instantanées. L'exemple le plus simple est celui des systèmes proie-prédateur où les interactions entre individus sont courtes et ne répondent qu'à un besoin purement alimentaire pour la survie et la reproduction. La seconde possibilité expérimentable est l'interaction prolongée avec un autre organisme, autrement dit des interactions durables. Les systèmes hôte-parasite s'inscrivent dans ce registre.

Littéralement, le mot hôte provient du latin *hospitem*, signifiant « celui qui est reçu » ou « celui qui reçoit ». En biologie, c'est la seconde version qui est couramment utilisée. Quant au mot parasite, il provient du grec ancien παράσιτος, « *parasitos* », et signifie manger (σιτος) à côté de (παρά). Au sens large du terme, un parasite est un organisme qui va exploiter le milieu de vie et les ressources que constitue son hôte sans que ce dernier n'en tire de bénéfices (Combes, 1995). Tout ou partie de la vie du parasite est donc dépendante directement de la survie de son hôte pour compléter son cycle et transmettre ses gènes. L'hôte n'est par conséquent plus une simple source d'approvisionnement énergétique mais il peut aussi devenir un habitat, une protection voire un moyen de dispersion. Il est possible de retrouver parmi les parasites une grande diversité d'organismes pouvant être classée en 3 grandes catégories : i) les microparasites : les virus, des bactéries, des fonges et des protozoaires, ii) les macroparasites : des helminthes et des arthropodes et iii) les parasitoïdes,

presque exclusivement constitués d'insectes. Pour faciliter cette distinction, l'utilisation du mot parasite dans la suite du manuscrit fera seulement référence aux microparasites.

Une autre échelle, temporelle cette fois, peut aussi être observée pour étudier ces interactions. Bien que tous les systèmes hôte-parasite soient des interactions durables, le temps d'exploitation de l'hôte peut grandement varier en fonction des parasites étudiés. La guêpe parasitoïde *Hymenoepimecis* fait partie des parasites qui vont utiliser leur hôte de manière transitoire pour franchir une étape de maturation. Elle va pondre un œuf sur l'abdomen d'une araignée procurant à la larve une source de protection et une source de nourriture. En effet, une fois l'œuf éclos, la larve de guêpe se nourrit de l'hémolymphe de l'araignée et va contraindre cette dernière à réaliser un cocon suspendu très résistant pour s'y momifier. La guêpe obtient ainsi un habitat protégé et une source alimentaire suffisante pour son développement en adulte (Eberhard, 2000, Gonzaga & Sobczak, 2007). À ce moment-là, la guêpe s'émancipera de son hôte, ce sera le stade dit « libre actif » de son cycle de vie où elle devra trouver un partenaire pour transmettre ses gènes et amorcer le cycle de la génération suivante.

A contrario, d'autres parasites dépendent de leur hôte à chaque étape de leur cycle de vie. Les bactéries endocytosomiques *Wolbachia* infectent au moins 20 % des espèces d'arthropodes. Elles vivent au sein du cytoplasme de leurs hôtes, et se transmettent par voie maternelle *via* les œufs (Werren *et al.*, 2008). Ces bactéries sont donc totalement dépendantes du succès reproducteur de leurs hôtes pour leur propre transmission (Ferdy & Godelle, 2005). Ces sont les parasites de la reproduction les plus fréquents et la vie de leur hôte, en elle-même, ne semble pas impactée par l'infection. Toutefois les *Wolbachia* manipulent la reproduction de leurs hôtes en créant un déséquilibre de sex-ratio en faveur d'une descendance féminine (Ma *et al.*, 2014).

Les coûts et conséquences que ces différents types de parasitisme ont sur les hôtes sont aussi extrêmement variables. Des bouleversements comportementaux, phénotypiques, physiologiques ou même immunologiques influencés par la présence du parasite peuvent être totalement délétères pour l'organisme hôte. Le cas du crustacé *Gammarus insensibilis* parasité par un trématode *Microphallus papillorobustus* fait office de cas d'école dans ce domaine. Le gammare vit naturellement dans l'eau et présente un comportement de géotactisme positif et phototactisme négatif lui conférant une protection face aux prédateurs potentiels. Ce comportement de protection devient toutefois aberrant lorsqu'il est parasité par le trématode (Thomas *et al.*, 1997). En effet, pour réaliser son cycle de vie, le trématode a besoin d'une étape de maturation dans un crustacé avant de finir son cycle de reproduction

dans un oiseau. À l'état de larve, il va s'enkyster dans le centre nerveux du gammare et s'y développer au stade de métacercarie. Une fois cette maturation réalisée, des changements physiologiques et immunitaires ont été observés au niveau neuronal chez le gammare, aboutissant à un changement de comportement (Helluy & Thomas, 2010). Les stimuli environnementaux provoqueront l'inverse du comportement protecteur et le gammare se retrouvera dans un endroit lumineux proche de la surface de l'eau à bouger frénétiquement. Ainsi, le parasite augmente fortement la prédation du gammare par les oiseaux qui pourront se nourrir sans difficulté du crustacé qui s'offre à eux.

La diversité et la complexité des interactions durables s'expriment aussi dans le nombre des acteurs intervenant dans le cycle parasitaire. Comme nous venons de le voir avec le trématode, ce n'est plus un parasite-un hôte, mais bien un parasite – deux hôtes. Des organismes intermédiaires peuvent ainsi prendre part au cycle de vie d'un parasite.

De manière obligatoire, les cycles de vie de certains parasites font intervenir plusieurs hôtes. Le plus souvent, on retrouve un cycle de 2 hôtes nécessaires au développement du parasite. Un autre exemple peut être celui du parasite responsable du paludisme chez l'homme. Les symptômes les plus courants sont une anémie et une répétition cyclique toutes les 48 à 72 heures de céphalées et de fortes fièvres. Environ 225 millions de cas sont détectés chaque année dont 1 million de décès. La forme la plus sévère et la plus mortelle est causée par *Plasmodium falciparum* (www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/fr). L'hôte principal, où la phase sexuée du parasite est réalisée, n'est cependant pas l'homme, mais des moustiques de l'espèce *Anopheles*. Après fécondation et migration, les sporozoïtes du parasite se retrouveront dans les glandes salivaires du moustique pour être transmis à l'hôte suivant lors d'un repas de sang. Une fois dans le second hôte, en l'occurrence l'homme, le parasite migre jusque dans les hépatocytes, s'y développe en stade de schizonte et rejoint ensuite la circulation sanguine où il subira de nouveau des phases de maturation. *P. falciparum* restera ensuite dans le sang, et le sang périphérique en particulier, jusqu'à ce qu'il soit transmis vers un nouveau moustique lors de son gorgement (Crompton *et al.*, 2014).

Les parasites peuvent aussi utiliser des hôtes intermédiaires de manière obligatoire mais qui n'entrent pas nécessairement dans leur cycle de maturation. Dans ce cas, ils servent surtout de moyen de locomotion entre un hôte et le suivant. On retrouve dans ce cas de figure les parasites, à l'origine de maladie non contagieuses, transmis par un vecteur (Figure 1). Exemple avec le virus du West Nile transporté par les moustiques d'un hôte au suivant (Martin-Acebes & Saiz, 2012).

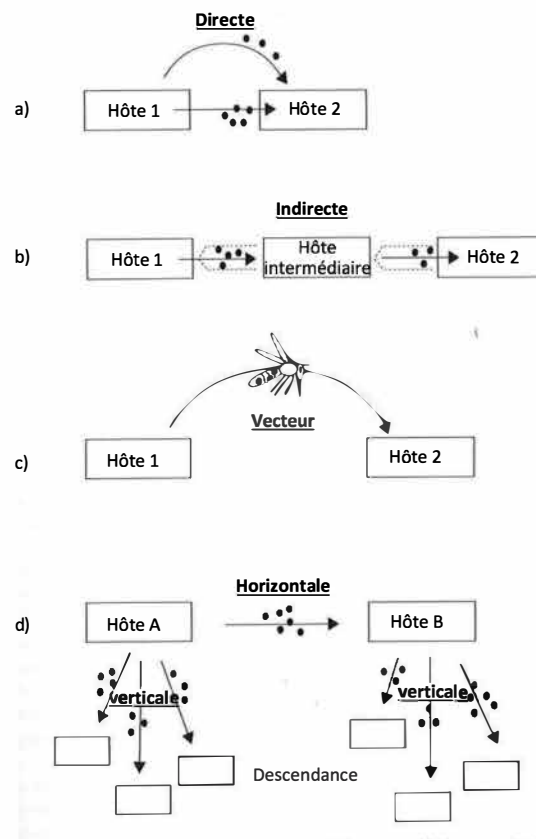


Figure 1 : Différentes modalités de transmission des parasites.

a) transmission directe par contact ou via le milieu (eau, air) ou via un véhicule souillé (déchets), (transmission contagieuse), b) transmission via un hôte intermédiaire, obligatoire ou facultatif, c) transmission par vecteur, (transmission non contagieuse), d) différentes voies de transmission du parasite : transmission horizontale d'un hôte à l'autre sur une même génération et transmission verticale d'un hôte d'une génération à un hôte de la génération suivante. Les cas a), b) et c) font aussi partie des transmissions dites horizontales (Schmid-Hempel, 2011).

Les hôtes naturels de ce virus à ARN sont les oiseaux, pour lesquels l'infection peut être mortelle. Puisque ce virus n'est pas contagieux par contact direct entre hôtes, la transmission d'un hôte au suivant nécessite l'intervention d'un vecteur, les moustiques du genre *Culex* ou *Aedes* (environ 60 espèces concernées). Des épidémies sporadiques au virus du West Nile ont toutefois été relevées chez des chevaux et des hommes, pouvant causer des paralysies flasques et des méningites, suite à des gorgements par des moustiques infectés. Cependant, le virus ne peut pas se multiplier correctement chez ces hôtes.

Telle que l'intervention de l'homme ou du cheval dans le cycle du virus du West Nile, d'autres parasites peuvent trouver des organismes intermédiaires intervenant accidentellement, de manière non obligatoire. Leur rôle est souvent l'apport d'un moyen supplémentaire d'atteindre l'hôte. L'agent étiologique de la Peste, la bactérie *Yersinia pestis*, en est ainsi un bon exemple. Le cycle de transmission naturel de ce parasite est totalement dépendant, dans la nature, des interactions entre les puces vectrices et les rongeurs qui en sont le réservoir naturel (Perry & Fetherston, 1997). Le contact de l'homme est accidentel et ne permet pas à la bactérie de se maintenir sur le long terme. Au mieux, elle y trouve un incubateur permettant une multiplication intense grâce également à une transmission directe homme-homme.

Cependant, dans une grande majorité de cas, l'hôte intermédiaire devient pour le parasite une impasse parasitaire. Le parasite devient incapable d'évoluer ou de se développer dans son nouvel hôte et/ou ne pourra plus se transmettre à l'hôte suivant. Un exemple pourrait être celui du nématode *Ancylostoma caninum*, dont l'hôte naturel est le chien. Le parasite s'y développe en stade adulte avant de se reproduire. Cependant, du fait de sa proximité avec les chiens, l'homme peut être contaminé. Toutefois, ce dernier est une impasse évolutive pour le parasite puisqu'il est incapable d'atteindre le stade adulte pour finir son cycle et va directement se loger dans les muscles de l'hôte avant de dégénérer (Gérardin, 2008).

Pour les hôtes intermédiaires, ce sont en règle générale ces interactions accidentelles avec le parasite qui ont un impact vraiment délétère pour leur survie. Ces hôtes ne faisant pas partie du cycle naturel du parasite, ils n'ont pu évoluer et s'adapter en conséquence.

Fondamentalement, les organismes portant les caractères les mieux adaptés à leur environnement, que ce soit physico-chimiques et/ou biologiques, auront un succès reproductif probablement meilleur (Combes, 1995). Les organismes rencontrés tout au long du cycle de développement seront soit profitables, soit délétères. Dans ce second cas, s'il parvient à se reproduire, l'organisme transmettra les gènes qui lui ont permis de faire face aux conséquences négatives de sa rencontre avec l'organisme délétère. Ces changements évolutifs, aboutissant à une meilleure adaptation à l'environnement, se réalisent de génération en génération. Ainsi les réponses des hôtes face aux agressions des parasites, aussi bien que les agressions des parasites face aux réponses des hôtes sont en perpétuel renouvellement. Cependant, à l'image des différents types de parasitisme pour lesquels des patrons communs sont observés, les réponses des hôtes face au parasitisme peuvent aussi être rassemblées en patrons communs (Figure 2).

La première chose que peut faire un hôte face à un parasite est de réduire son exposition (Figure 2). S'il n'y a pas d'exposition, il n'y a pas de problème. Souvent, cette réponse se traduit par un changement comportemental tel que l'évitement d'aliments contaminés, ou en d'autres termes la sélection d'aliments non contaminés. Par exemple, les moutons ont tendance à ne pas brouter dans des pâturages se trouvant à proximité d'excréments frais (Cooper *et al.*, 2000). D'autres prennent soin de réduire leur exposition à des zones infectées. Les babouins changent régulièrement de sites de nidification. Cette rotation leur permet de minimiser leur exposition aux parasites nématodes se retrouvant dans les fèces aux pieds des arbres sur lesquels ils dorment. Le turnover entre leurs différents sites est d'environ 11 jours, et correspond au temps de survie moyen des nématodes (Hausfater & Meade, 1982). Un second comportement plusieurs fois décrit dans la nature est le nettoyage environnemental ou corporel comme celui observé chez la souris, où les individus amputés d'un membre se retrouvent 30 fois plus contaminés par les puces que les individus témoins (Hart, 1990).

Une fois le contact établi, l'hôte peut répondre en réduisant le risque d'infection (Figure 2). Les barrières anatomiques telles que la peau et la cuticule, ou les muqueuses et les endothéliums, qui présentent des propriétés physico-chimiques particulières, ont ce rôle. Elles réduisent le franchissement de tout corps étranger provenant de l'environnement externe. D'autres stratégies empêchent le parasite de se développer correctement.

Une des formes les plus extrêmes qui peut être observée est l'apparition de mutations génétiques conférant une protection dans des zones de forte densité parasitaire. Ces mutations ne sont pas une réponse directe au parasitisme mais confèrent souvent une meilleure valeur sélective aux porteurs de ces mutations. Un des exemples les plus connus est la drépanocytose chez l'homme, maladie génétique héréditaire déformant les érythrocytes (= globules rouges = hématies) en forme de faucille lors de manque d'oxygène. Cette maladie se manifeste dans les populations où les parasites du genre *Plasmodium* sont les plus prévalents dans l'environnement. Les *Plasmodium* ont besoin des érythrocytes au cours de leur développement pour d'une part s'y multiplier, et d'autre part se déplacer et se transmettre au moustique lors de son repas de sang. Ainsi, la drépanocytose empêche le parasite de terminer son cycle grâce à la déformation des érythrocytes provoquée par l'anomalie génétique (<http://www.cdc.gov/malaria/about/biology>) (Wright & Rayner, 2014). Cependant, ce type de réponse de la part des hôtes a un coût non négligeable. En effet, les érythrocytes sont très importants au bon fonctionnement d'un organisme puisqu'ils transportent l'oxygène aux tissus, évacuent le CO₂, régulent le pH et permettent de faire circuler des complexes immuns à travers le corps lors d'infection. Chez des personnes drépanocytaires, en contrepartie de gagner une réponse efficace à l'invasion du parasite, la circulation sanguine

ne se produit plus correctement. La forme de faucille des érythrocytes bouchent les capillaires, empêchant une bonne oxygénation des organes et les personnes atteintes sont, parmi de nombreux autres symptômes, très souvent anémiées (Chakravorty & Williams, 2015).

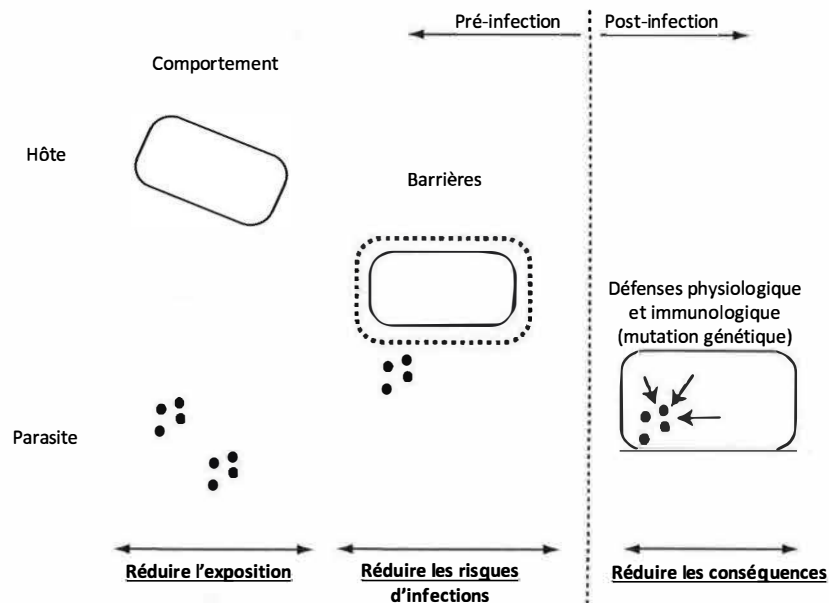


Figure 2 : Séquence de défense d'un hôte face à un parasite.

Le rectangle représente l'hôte et les ronds noirs les parasites. (Schmid-Hempel, 2011)

Toutefois, un certain nombre de parasites arrive à entrer et infecter les organismes. À ce stade, un dernier type de réponse, le système immunitaire, est mis en place afin de réduire les conséquences provoquées par la présence du parasite (Figure 2). Il allie des mécanismes physiologiques et chimiques d'une grande complexité et se charge de contrer le développement du parasite en essayant cette fois de l'éliminer totalement de l'organisme hôte. Ce système est développé par la quasi-totalité des organismes pluricellulaires (Buchmann, 2014) et permet de combattre une très grande diversité de parasites. Le système immunitaire est basé sur un ensemble d'éléments de reconnaissance de l'organisme discriminant le 'soi' du 'non-soi' pour déclencher une cascade d'événements. Le 'non-soi' est surtout caractérisé par des motifs moléculaires de surface, conservés et discriminants chez les parasites, non présents naturellement chez l'hôte. Les principaux types de molécules du 'non-soi' retrouvés sont des lipopolysaccharides (LPS), des mannanes et des peptidoglycanes

(Medzhitov & Janeway, 1997). C'est un système en perpétuel renouvellement où le moindre changement environnemental entraîne une cascade de réactions physico-chimiques (Owen *et al.*, 2013).

Les principales réactions qui se produisent dans le système immunitaire des invertébrés, notamment chez les insectes, sont basées pour une partie sur des réponses de type cellulaire. On y trouve des réactions d'opsonisation, de phagocytose, de mélanisation, d'encapsulation, et de coagulation lors de blessures (Schmid-Hempel, 2005). La phagocytose réalisée par des plasmocytes est la forme de défense la plus simple avec la mélanisation. Cette dernière consiste à déposer sur le parasite de la mélanine produite par des cellules cristal qui, une fois en contact avec un hémocyte, sera pris en charge pour être encapsulé. L'encapsulation est aussi un procédé réalisé sur certaines cellules infectées. L'autre partie fait appel à un procédé de type humoral, souvent grâce à des molécules circulant dans l'hémolymphe. Ainsi des substances cytotoxiques ; des espèces réactives de l'oxygène : peroxyde, nitrogène type oxyde nitrique et quinoïdes ; des peptides antimicrobiens : plusieurs isoformes de protéines précurseurs peuvent être retrouvées permettant une amplification rapide ; et toute une gamme de molécules de défense, lysozymes, enzymes protéolytiques et hydrolytiques, est également produite pour faire face à un grand nombre d'agresseurs. Les 2 types de réponse, cellulaire et humorale, ne s'excluent pas pour autant et sont capables de se combiner pour augmenter la spécificité de la réponse face aux parasites (Schmid-Hempel, 2005, Schmid-Hempel, 2011).

Le système immunitaire des vertébrés est quant à lui un système biologique plus complexe, constitué d'éléments coordonnés et hautement adaptatifs. Il fait appel à deux mécanismes de défense différents, complémentaires et coopératifs, appelés immunité innée et immunité adaptative. L'immunité innée, bien que plus développée que chez les invertébrés, présente une base commune grâce à des mécanismes généralistes qui interviennent rapidement après une agression, de quelques minutes à quelques heures. Elle répond de manière unique à chaque fois qu'elle est sollicitée. Les intervenants majeurs sont des molécules de type humoral ainsi que des cellules phagocytaires et des molécules de reconnaissance de motifs (principalement des récepteurs liés aux membranes). L'immunité adaptative intervient en second lieu lorsque l'immunité innée n'a pas été en mesure d'éliminer le parasite (Figure 3). Elle met plusieurs jours à survenir et implique un système interconnecté de cellules et de signaux chimiques. Son développement est orienté par les premières informations récoltées par le système immunitaire inné. Elle est plus spécialisée grâce à ces effecteurs tels que les lymphocytes, les récepteurs spécifiques d'antigène et les anticorps. Elle peut s'adapter en temps réel pour augmenter la réponse immunitaire. Ainsi, l'immunité adaptative devient aussi plus rapide et plus efficace à chaque nouvelle exposition

(Owen *et al.*, 2013). Dès lors, soit les organismes parasites sont totalement détruits par le système immunitaire, comme la plupart des virus respiratoires tel que le virus de la grippe chez l'homme (Kohlmeier & Woodland, 2009), soit le système immunitaire empêche au moins en partie le bon déroulement du cycle du parasite. Plusieurs études ont notamment montré que lorsqu'un hôte devient résistant aux tiques, ces dernières prennent des repas de sang moins importants, la quantité et/ou la viabilité de leur progéniture est diminuée, le cycle de développement peut être perturbé, voire dans certains cas les tiques meurent prématurément après le repas de sang (Wikel, 1996).

Essayer de comprendre comment interagit un système hôte-parasite, que ce soit dans un but préventif ou curatif des effets néfastes de ces derniers, nécessite donc de prendre en compte l'ampleur des implications, interactions, incidences et conséquences qui interviennent lorsque les organismes se rencontrent.

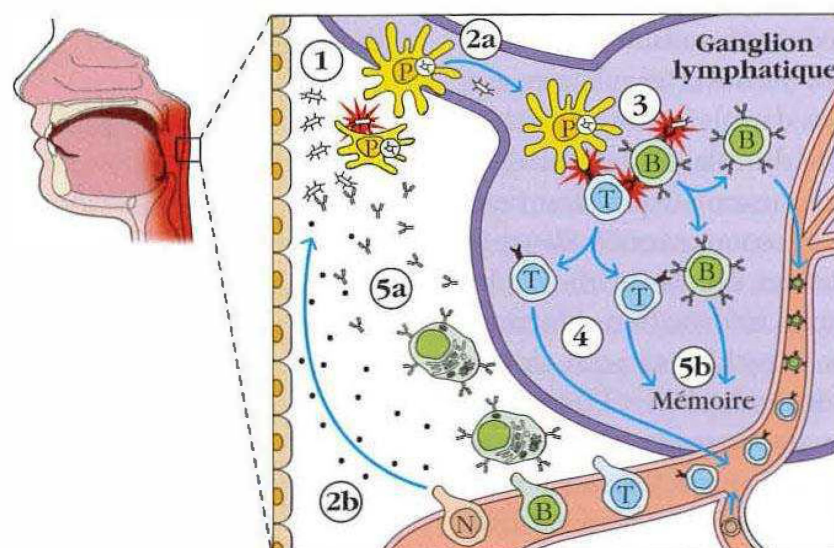


Figure 3 : Coopération entre les réponses immunitaires innée et adaptative pour combattre une infection. Schéma simplifié montrant la séquence d'événements qui se produit au cours d'une réponse immunitaire. 1) Introduction des parasites qui sont pris en charge par les cellules phagocytaires (jaunes). 2a) Réponse innée où la cellule phagocytaire subit des modifications et amène des morceaux du parasite à un ganglion lymphatique local pour activation de l'immunité adaptative. 2b) en parallèle, d'autres phagocytes résidents rencontrent les antigènes du parasite et sécrètent des cytokines et des chimiokines (ronds noirs) permettant le recrutement d'autres cellules immunitaires sur le site d'infection. 3) Dans le ganglion lymphatique, les lymphocytes T (bleues) et B (vertes) ayant le récepteur avec la spécificité appropriée sont sélectionnés clonalement. 4) La coopération entre les lymphocytes T et B conduit à la prolifération et à la différenciation des lymphocytes, pour identifier spécifiquement et éradiquer le parasite. 5a) production d'anticorps spécifiques par les lymphocytes B pour aider à repérer et éradiquer le parasite. 5b) Production en parallèle de cellules T et B mémoire disponibles lors de l'initiation d'une réponse secondaire plus rapide et spécifique (Owen *et al.*, 2013)

II. Le modèle d'étude et les objectifs de l'étude.

Le système hôte–parasite étudié dans ce projet de thèse relève de cette complexité décrite précédemment puisqu'il fait intervenir 3 protagonistes.

- Le parasite : le virus de la peste porcine africaine, qui est hautement létal chez les porcs domestiques, mais qui ne provoque aucun symptôme chez la plupart des suidés sauvages africains.
- L'hôte sensible : le porc domestique, devenu une source importante de protéines sur le marché agronomique mondial et dont la production est sujette à des implications socio-économiques considérables.
- L'hôte vecteur : la tique *Ornithodoros*, qui peut transmettre le virus aux porcs et à certains suidés sauvages, mais aussi être un réservoir du virus grâce à une circulation du virus au sein même de la population de tiques.

Chacun a développé différentes stratégies pour faire face aux autres. En se concentrant principalement sur les tiques *Ornithodoros* et à travers les trois objectifs suivants, nous allons essayer de mieux appréhender ce trio :

I) Qu'est-ce que la compétence vectorielle des tiques *Ornithodoros* pour le virus de la peste porcine africaine ? Comment la caractériser et comment l'évaluer ? À travers une synthèse bibliographique, nous allons examiner l'état de l'art de la compétence vectorielle connu actuellement chez les tiques *Ornithodoros* pour le virus de la peste porcine africaine, et comparer les méthodes et les mesures de compétence utilisées par les auteurs pour étudier la transmission du virus au porc par les tiques.

II) Qu'en est-il de la compétence vectorielle de tiques *Ornithodoros* pour un virus de la PPA de génotype II. Afin d'évaluer le risque de transmission vectorielle en Europe face à la progression en Europe de l'est depuis 2007 de souches virales de génotype II, nous avons réalisé des essais d'infections de 2 souches virales (dont la souche d'Europe de l'est) sur 3 espèces de tiques *Ornithodoros* (dont l'espèce européenne) et des essais de transmissions de ces souches au porc domestique

III) Quels facteurs intrinsèques aux tiques peuvent influencer la compétence vectorielle et notamment l'étape essentielle de transmission du virus au porc ? À travers une étude expérimentale, nous avons voulu étudier l'impact de la salive de tique *Ornithodoros* sur le système immunitaire du porc domestique lors d'une inoculation intradermique du virus co-inoculé ou non avec des extraits de glandes salivaires de tiques.

III. Présentation de la Peste porcine africaine et de ce qui est connu de l'implication des tiques vectrices *Ornithodoros*.

A. Historique et répartition actuelle.

Depuis sa découverte au Kenya en 1909 et sa description par Montgomery en 1921 (Montgomery, 1921), la peste porcine africaine (PPA) est une maladie qui reste un fléau chez les éleveurs de porc puisqu'elle peut provoquer la perte d'un troupeau en une dizaine de jours dès l'apparition des premiers symptômes (OIE, 2012). L'Afrique est le continent le plus concerné puisque la quasi-totalité des pays au sud du Sahara ont été touchés par au moins un épisode de la maladie au cours du siècle dernier. La maladie est d'ailleurs devenue endémique chez les porcs domestiques dans presque tous les pays entre le Sénégal et Madagascar (Figure 4). Dans ces pays, lorsqu'elle n'est pas endémique, des épizooties sporadiques sont régulièrement déclarées. Le virus se retrouve aussi dans les populations de suidés sauvages en Afrique de l'est et du sud, qui constituent son réservoir naturel (Penrith *et al.*, 2013). Son confinement au continent africain a duré jusqu'en 1957 quand une épidémie a été déclarée au Portugal, puis en 1960 s'est répandue dans toute la péninsule ibérique suite à des mouvements illicites d'animaux. Depuis, la maladie s'est propagée, principalement par ce biais, dans d'autres pays européens comme par exemple en France en 1964, 1967 et 1977, et en Amérique du sud et les Caraïbes à la fin des années 1970 (Costard *et al.*, 2009, Plowright *et al.*, 1994). À l'exception de la Sardaigne, où la PPA est devenue endémique depuis 1978 (Mur *et al.*, 2014), la maladie a été éradiquée dans ces pays suite à de gros efforts de campagnes d'abattage massif, de vide sanitaire et de contrôles des mouvements d'animaux. Cependant, depuis 2007, elle est de nouveau présente sur le continent européen suite à une introduction en Géorgie, ayant probablement pour cause une mauvaise gestion des déchets de viande de porc contaminée en provenance du Mozambique ou de Madagascar (<http://www.promedmail.org> archive n°20070920.3131). Elle s'est depuis répandue dans un premier temps dans les autres pays du Caucase et jusqu'au nord de la Russie et s'étend aujourd'hui jusqu'en Pologne (Figure 5).

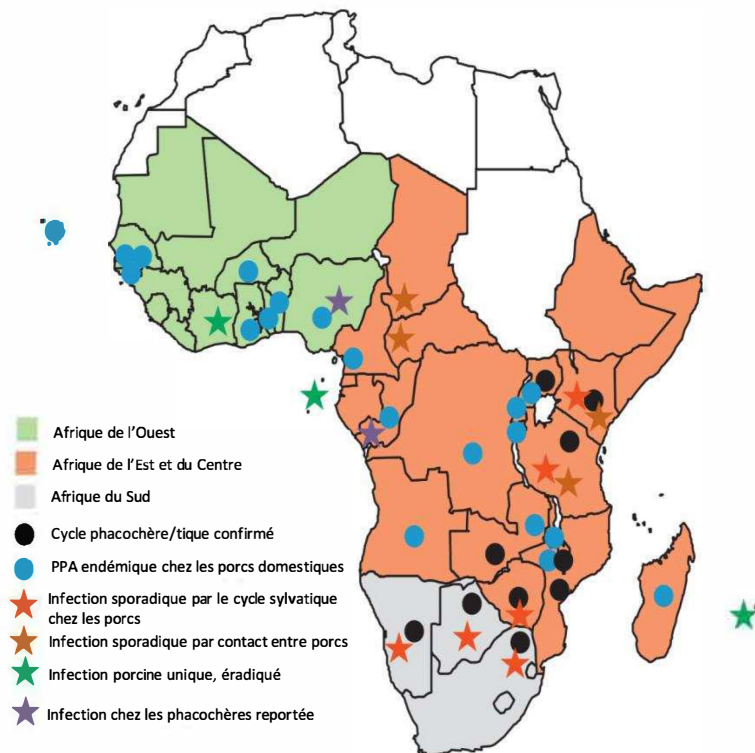


Figure 4 : Distribution de la peste porcine africaine en Afrique. (Penrith *et al.*, 2013).

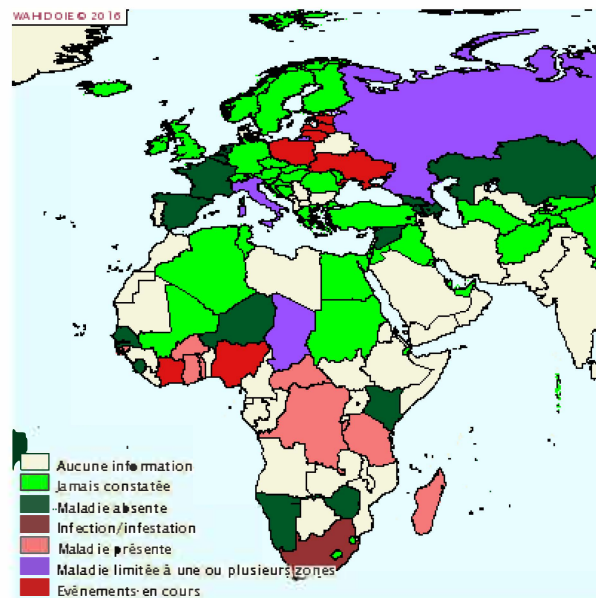


Figure 5 : carte de distribution des déclarations de cas de la PPA entre janvier et juin 2015 chez les suidés sauvages et domestiques.
(<http://www.oie.int/fr>)

B. Pathologie et impacts de la maladie

La PPA est une maladie réglementée à déclaration obligatoire auprès de l'organisation mondiale de la santé animale (OIE). Elle est d'origine virale, hautement contagieuse, et présente un fort taux de morbidité et un taux de mortalité pouvant atteindre les 100 %. Les signes cliniques sont typiques d'une fièvre hémorragique et peuvent être confondus avec ceux de la Peste porcine classique sans un diagnostic confirmé par un test en laboratoire (Vannier *et al.*, 2010). Les signes cliniques courants sont de fortes fièvres, une perte d'appétit, une faiblesse des animaux, associés à des problèmes digestifs et respiratoires puis une hémorragie extensive aboutissant au décès (Galindo-Cardiel *et al.*, 2013). Les lésions internes, observables durant la nécropsie sont également importantes avec des pétéchies (petits points hémorragiques sur la plupart des organes et notamment les reins), des ganglions hyperréactifs et une rate noire et friable (Galindo-Cardiel *et al.*, 2013).

La maladie peut prendre plusieurs formes en fonction de la souche de virus et de la race de suidés (Galindo-Cardiel *et al.*, 2013, Blome *et al.*, 2013). La forme subaiguë présente une fièvre pouvant atteindre 42 °C (la température corporelle moyenne des porcs étant de 39 °C), une mort dans les 7 jours suivant l'infection et un taux de mortalité avoisinant 100 %. À l'opposé, la forme chronique de la maladie présente une large diversité de lésions et de signes cliniques souvent imperceptibles (hyperthermie rarement supérieure à 40,5 °C). La mort survient plusieurs mois après l'infection et le taux de mortalité est souvent inférieur à 30 %. Cette forme de la maladie est cependant la moins courante.

Les impacts sanitaires de la maladie sont d'autant plus importants qu'aucun traitement ni vaccin n'existe. Pour prévenir l'extension de la maladie et des mortalités massives d'animaux, les seuls moyens de contrôle sont la mise en place d'une quarantaine des élevages touchés lors de la suspicion, puis lorsque le diagnostic est confirmé, un abattage massif des animaux en contact avec le virus et une désinfection totale des locaux et des équipements.

Les enjeux socio-économiques sont donc considérables. Dans les pays où la production de porc est le moyen le plus rapide et le moins coûteux d'accéder à une source de protéines de qualité, les pertes économiques dans les secteurs de production porcine ainsi que les répercussions sanitaires pour la population sont catastrophiques. Mais l'impact est encore plus grand chez les petits producteurs qui n'ont pas les ressources financières pour redémarrer un élevage sans aide de l'état et où les moyens de prévention et de contrôle ne peuvent pas, le plus souvent, être mis en place correctement (Costard *et al.*, 2009).

C. L'agent étiologique : le virus de la peste porcine africaine

Le virus à l'origine de la maladie est un virus tout à fait particulier. Il fait partie de la famille des *Asfarviridae* dont il est le seul membre. C'est un virus enveloppé par une membrane lipidique contenant une capside de forme icosaédrique qui renferme le génome à ADN double brin. La taille du virus est comprise entre 175 et 215 nm de diamètre. La taille du génome est quant à elle de 170 à 190 kb et code 151 à 167 cadres ouverts de lecture. La différence de taille que l'on peut trouver entre les souches est principalement due à des gains ou des pertes de ces cadres de lecture appartenant à 5 familles multigéniques (environ 30 % du génome) : MGF 360, MGF 110, MGF 300, MGF 530 (ou 505) et MGF 100 (Dixon *et al.*, 2013).

Une autre particularité de ce virus est d'être totalement indépendant des ARN polymérases des cellules hôtes lors de sa transcription. En effet, il produit des enzymes capables de synthétiser les précurseurs de la réplication d'ADN, des enzymes de réplication et de modification de l'ADN, ainsi que des enzymes de transcription et modification de l'ARN (Yanez *et al.*, 1995). Cette caractéristique lui permet en théorie de se répliquer dans n'importe quelle cellule hôte et pourrait expliquer pourquoi ce virus est aujourd'hui le seul arbovirus à ADN connu (virus transmis par un vecteur) pouvant se multiplier à la fois chez ses hôtes mammifères et chez les tiques (Nix, 2006).

L'une des dernières caractéristiques qui rend le virus de la PPA particulier est son pouvoir hémasorbant (HAD), grâce à la protéine transmembranaire CD2v, seule protéine glycosylée qu'il possède (Ruiz-Gonzalvo *et al.*, 1996). *In vivo*, l'association préférentielle globule rouge-virus se traduit par une forte virémie chez les animaux et faciliterait aussi, par ce biais, la dissémination du virus dans l'organisme. Cette caractéristique a permis de mettre au point une méthode de détection en culture cellulaire moins subjective que l'identification des effets cytopathogènes (ECP) que l'on évalue chez la plupart des autres virus en culture, le test d'hémasorption. Il consiste en l'observation de « rosettes » : macrophages infectés entourés ou recouverts de globules rouges (Malmquist & Hay, 1960). Cependant, une partie des souches du virus de la PPA ne sont pas hémasorbantes, elles doivent donc être suivies en culture cellulaire par des ECP classiques. La capacité d'infection, voire même la virulence, des souches de PPA pour ces différents hôtes serait d'ailleurs en grande partie corrélée à son pouvoir hémasorbant et à la présence des familles multigéniques (Afonso *et al.*, 2004, Borca *et al.*, 1998, Tabares *et al.*, 1987, Zsak *et al.*, 2001).

Concernant le cycle de réplication cellulaire du virus de la PPA (Figure 6), la protéine d'attachement du virus p12 a été identifiée comme liant le virus aux récepteurs membranaires des cellules cibles (Angulo *et al.*, 1992). Les protéines virales P72 (VP72), protéine de surface

majeure de la capside, et VP54, protéine externe de la surface membranaire, seraient aussi responsables de l'attachement (Gomez-Puertas *et al.*, 1996). Après cette étape, le virus pénètre dans la cellule par endocytose, dont la protéine VP34 est la principale instigatrice (Gomez-Puertas *et al.*, 1996). L'enveloppe virale va fusionner avec la membrane du lysosome ou de l'endosome dans lequel il est enfermé, libérant ainsi les premières enzymes et facteurs de réplication. Immédiatement après son entrée dans le cytoplasme, la phase précoce de synthèse protéique y est donc déclenchée. Le début de la réplication virale est amorcé dans le noyau cellulaire par la génération de très courts fragments d'ADN. Ensuite, la réplication de l'ADN est principalement réalisée dans le cytoplasme environ 6 heures après l'infection. Les usines virales périnucléaires installées dans le cytoplasme vont produire des fragments de génomes plus grands qui, une fois synthétisés en totalité, seront concaténés en une seule unité génomique (Rojo *et al.*, 1999). Le nombre des usines virales augmente fortement entre 12 et 18 heures post-infection (pi) (Brookes *et al.*, 1996). L'expression des gènes tardifs se poursuit par la fabrication d'ARNm codant des structures protéiques et enzymatiques nécessaires aux phases précoces des prochaines infections. Ainsi, les protéines majeures de la structure du virus sont produites, telles que la VP220 essentielle à l'assemblage du cœur viral et son enveloppement (Andres *et al.*, 2002). L'enveloppement du noyau nucléoprotéique sera ensuite réalisé en détournant la membrane du réticulum endoplasmique de la cellule hôte. La protéine VP54 joue un rôle intermédiaire, en permettant le recrutement des structures membranaires du réticulum endoplasmique vers les usines virales (Rodriguez *et al.*, 2004). L'assemblage des virions matures se produit au moment de leur départ de l'usine virale. Ils seront ensuite transportés via des microtubules jusqu'à la membrane cellulaire d'où ils ressortiront par bourgeonnement (Dixon *et al.*, 2013, Netherton & Wileman, 2013).

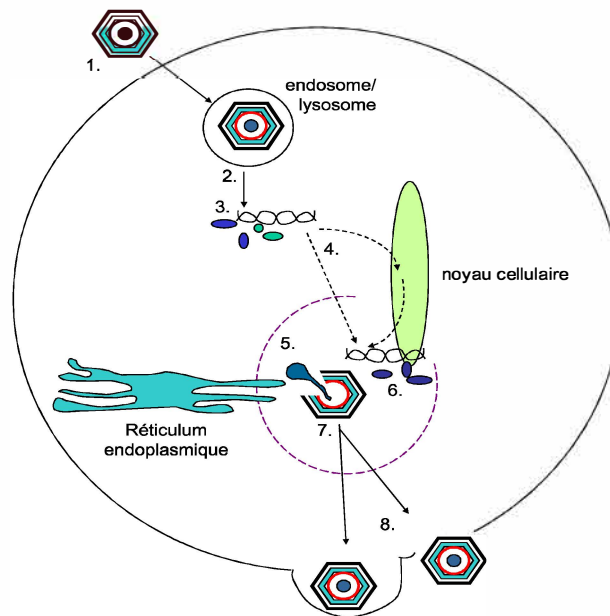


Figure 6 : Cycle réplcatif du virus de la PPA.

1) pénétration du virus dans la cellule par endocytose après reconnaissance par le(s) récepteur(s). 2) libération de l'ADN viral et des enzymes du virion suite à la fusion de la membrane virale avec celle des endosomes/lysosomes. 3) synthèse des protéines précoces dans le cytoplasme. 4) réplication de l'ADN précoce dans le noyau et de l'ADN principal dans les usines virales périnucléaires dans le cytoplasme. 5) morphogénèse grâce à l'enveloppement du cœur nucléoprotéique par la membrane du réticulum endoplasmique formant la capsid du virus. 6) expression des gènes intermédiaires et tardifs en fonction de l'avancement de la réplication pour la fabrication des protéines de structure et des enzymes virales. 7) Assemblage des virions. 8) transport vers la membrane de la cellule infectée pour une sortie par bourgeonnement à travers la membrane (acquisition de l'enveloppe externe) ou par lyse de la cellule. (Nix, 2006).

Les principales cibles du virus sont, chez le porc, les monocytes et macrophages (Gomez-Villamandos *et al.*, 2013). Le virus va se lier à ces cellules via des récepteurs membranaires et notamment la protéine CD163 et le SWC9 des macrophages (marqueurs de maturation des monocytes) (Sanchez-Torres *et al.*, 2003, McCullough *et al.*, 1999). Cependant, d'autres types de cellules immunitaires peuvent aussi être infectés : les cellules dendritiques (DC) et endothéliales (Vallée *et al.*, 2001), les mégacaryocytes, les neutrophiles, les lymphocytes et même les plaquettes (Gomez-Villamandos *et al.*, 2013, Carrasco *et al.*, 1992, Fernandez *et al.*, 1992). L'analyse du génome complet d'une souche espagnole du virus a montré la présence de gènes codant des protéines impliquées dans l'adhésion des cellules ainsi que dans l'apoptose et le métabolisme d'oxydoréduction (redox) (Yanez *et al.*, 1995). L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire programmée indispensable à l'équilibre contrôlant la prolifération du nombre de cellules dans l'organisme. Lors de l'infection des cellules, la mort

précoce de ces dernières va permettre de diminuer la réplication et la dispersion du virus. Le métabolisme redox est quant à lui impliqué dans la respiration cellulaire fournissant l'énergie nécessaire aux cellules pour fonctionner.

En intervenant sur ces deux mécanismes fondamentaux du fonctionnement cellulaire, le virus est donc en mesure de moduler une partie de l'immunité du porc. En outre, un mécanisme de surrégulation de la migration des cellules immunitaires est déclenché lorsque les monocytes–macrophages se retrouvent infectés. En effet, une surproduction de cytokines Facteur de nécrose de tumeur de type- α (TNF- α *tumor necrosis factor*) est observée (Gomez-Villamandos *et al.*, 2013, Gomez del Moral *et al.*, 1999). Cette cytokine pro-inflammatoire est produite en réponse à une infection, inflammation ou à des facteurs de stress environnementaux, mais elle est principalement impliquée dans les phases précoces d'une réponse inflammatoire antivirale. Elle va agir localement en augmentant la perméabilité vasculaire et aider au recrutement et à l'activation des cellules immunitaires sur le site d'infection (Owen *et al.*, 2013). Elle permet donc le recrutement de nouvelles cellules cibles du virus. Suivant la souche, le virus serait également capable de réguler la prolifération des lymphocytes T (LT) et l'action des lymphocytes T cytotoxiques (LTc) envers les cellules infectées à travers l'expression de la protéine CD2v, similaire à la molécule d'adhésion CD2 des LT. La protéine CD2v serait aussi impliquée dans les mécanismes de virulence et d'échappement immunitaire lorsqu'elle interagit avec le facteur de transcription AP-1 qui joue un rôle dans les voies de signalisation entre l'appareil de Golgi et les endosomes (Perez-Nunez *et al.*, 2015). Une autre étude a montré qu'une souche virulente de virus pouvait inhiber *in vitro* l'activité des cellules natural killer (NK) de cellules du sang périphérique de porcs (Norley & Wardley, 1983). De plus, des études portant sur l'infection des porcs par la souche de virus NH/P68 atténuée ont montré que l'activité des cellules NK était faible et proche du groupe témoin (Leitao *et al.*, 2001). Enfin, le virus est aussi connu pour retarder l'apoptose des cellules infectées et modulerait celle des LT. Ainsi la production de signaux pro-inflammatoires se trouve limitée et la dissémination du virus favorisée (Vallée *et al.*, 2001, Dixon *et al.*, 2004, Sanchez *et al.*, 2013, Alonso *et al.*, 2013).

D. Cycle épidémiologique

Il existe 3 cycles de transmission du virus dans la nature (Figure 7).

1. Cycle selvatique

Le cycle selvatique, principalement retrouvé en Afrique austral et Afrique de l'est, est probablement le cycle de transmission virale le plus ancien et le plus naturel. La voie de transmission du virus y est principalement une transmission directe entre animaux. On retrouve 2 types d'hôtes dans ce cycle, des suidés sauvages africains avec principalement les phacochères (*Phaechochoerus africanus*) et dans une moindre mesure les potamochères (*Potamochoerus porcus*) qui sont tous des porteurs asymptomatiques de la maladie ; et un vecteur arthropode, la tique *Ornithodoros moubata sensu lato*.

Une grande partie des études ont porté sur les phacochères (Heuschele & Coggins, 1969, Plowright, 1977, Thomson *et al.*, 1983). La particularité de cette espèce est que seuls les jeunes, jusqu'à environ 24 mois, sont virémiques (Heuschele & Coggins, 1969, Plowright *et al.*, 1974). La prévalence du virus chez les marcassins est de plus de 90 % la première année et chute à 21 % après la quatrième année (Plowright, 1977). Toutefois, il n'y a ni transmission transplacentaire du virus ni transmission par allaitement. Chez les adultes, le virus ne se retrouve que dans certains organes, majoritairement des ganglions et la rate (Heuschele & Coggins, 1969). De ce fait, le rôle des phacochères adultes dans la persistance du virus est assez limité (Plowright *et al.*, 1969b, Plowright, 1977). Cependant, le contact avec les marcassins excréteurs peut permettre de maintenir une circulation du virus au sein des populations. Les marcassins ont aussi un autre rôle, ils permettent sur une courte période de temps et grâce à une virémie suffisante, une transmission efficace du virus aux tiques vivant dans les terriers et se gorgeant sur ces derniers. Les tiques jouent aussi un rôle crucial dans le maintien du virus et notamment parce que le virus peut circuler au sein de la population de tiques grâce à de la transmissions sexuelle et de la transmission transovarienne qui est la transmission du virus par les femelles à la descendance (Jori & Bastos, 2009, Kleiboeker & Scoles, 2001). Les phacochères adultes auraient selon certains auteurs un second rôle dans ce cycle puisqu'ils offriraient, occasionnellement, aux tiques une dissémination géographique éventuellement jusqu'aux élevages porcins (Plowright *et al.*, 1994).

Le rôle des potamochères est moins connu, leur répartition est similaire à celui des phacochères, mais leur préférence d'habitat différente. Les études réalisées montrent un taux de prévalence d'infection pour le virus de la PPA beaucoup plus faible chez ces animaux que chez les phacochères, toutefois la transmission du virus par contact avec des porcs domestiques a été démontrée (Anderson *et al.*, 1998). De plus, il est possible de les retrouver

à proximité immédiate des fermes en Ouganda, ce qui fait des potamochères des acteurs potentiellement importants dans ce cycle épidémiologique (Jori *et al.*, 2013).

Certaines populations de porcs domestiques dites « rustiques » en Afrique, très minoritaires, seraient devenues résistantes au virus et pourraient alors être intégrés au cycle selvatique. En effet, une étude a montré que la souche de virus Malawi présente une différence de pathogénicité sur les porcs domestiques européens et africains, avec un fort taux de mortalité chez les premiers contrairement aux seconds. Ces porcs pourraient être séropositifs et développer une infection subclinique, présentant une virémie sans signe clinique observé (Haresnape & Wilkinson, 1989). Il est envisageable que la PPA, s'étant installée de façon enzootique dans ces aires, ait pu se transmettre au porc lors d'une primo-infection bénigne, lui conférant ainsi une immunité à travers une séroconversion et l'apparition d'anticorps circulants (Penrith *et al.*, 2004). Les tiques pourraient aussi être à l'origine de ce phénomène. Il est possible que le nombre de tiques infectées soit suffisamment faible pour que la probabilité de rencontre ne suffise pas à déclencher la maladie et/ou que la dose de virus injectée lors du repas de sang soit insuffisante (Haresnape & Wilkinson, 1989). Toutefois, cette immunité reste une immunité acquise puisqu'aucune étude n'a montré d'hérédité de cette résistance à la descendance.

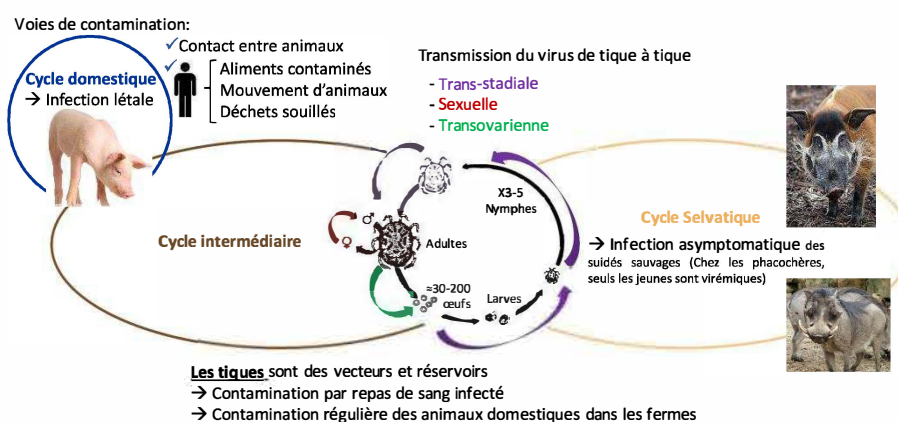


Figure 7 : Cycles épidémiologiques du virus.

La voie principale de transmission du virus est par contact direct entre les animaux malades. Lorsque les tiques sont présentes comme dans le cycle intermédiaire et selvatique, la transmission horizontale du virus se fait lors des repas de sang et de l'excrétion de liquide coxal infecté. Le nombre de transmission possible par tique peut être conséquent puisqu'un repas de sang est nécessaire à la tique à chaque stade pour muer jusqu'au stade adulte et pour pondre et que plusieurs pontes peuvent être réalisées. Le cycle domestique est le cycle épidémiologique, d'infection et de propagation du virus le plus commun, par contact direct entre les animaux et par l'intervention de l'homme lors du transport des animaux malades ou lors de mauvaise décontamination des matériels.

2. Cycle intermédiaire

Le cycle intermédiaire met en scène les tiques *Ornithodoros* et les porcs domestiques. Les tiques sont, dans ce cycle comme dans le précédent, des vecteurs et des réservoirs du virus, toujours grâce à des transmissions sexuelle et transovarienne, ce qui permet au virus un maintien sur le long terme dans les zones contaminées. Cependant, les tiques ne jouent pas un rôle actif dans l'expansion géographique du virus.

Ce cycle se retrouve principalement dans les petites fermes ou exploitations familiales où les tiques s'installent durablement dans les bâtiments d'élevage. Il a été mis en évidence dans la péninsule ibérique et en Afrique, dans les fermes où seule la présence de tiques gorgées lors d'un précédent repas infectieux sur les porcs virémiques pouvait être à l'origine des nouvelles épidémies (Haresnape & Wilkinson, 1989, Perez-sanchez *et al.*, 1994). La présence des tiques est cependant difficile à détecter, ainsi que la désinfestation des locaux à réaliser, puisqu'elles vivent dans les fissures des murs des porcheries et des habitations.

3. Cycle domestique

C'est le cycle de contamination prédominant en Europe et suspecté dans certains pays d'Afrique de l'est où des foyers épidémiques persistent sans qu'il y ait la présence de tiques ou l'existence d'un cycle sauvage à proximité. Deux modes de contamination principaux sont à l'origine de ce cycle et permettent au virus une dissémination géographique rapide et à longue distance (Kleiboeker & Scoles, 2001). Le premier fait appel à la résistance du virus de la PPA à son environnement. En effet, le virus peut résister 18 mois dans un sérum à température ambiante (Montgomery, 1921), rester infectieux plusieurs mois dans des viandes de porc fumées, salées ou congelées (Adkin *et al.*, 2004). Il résiste 20 minutes chauffé à 60 °C et à une gamme de pH entre 4 et 13,4 (Mebus *et al.*, 1997, Detray, 1963). Grâce à cela, il peut être facilement transporté sur des objets souillés, ou persister dans les produits porcins transformés donnés comme aliments aux porcs. La seconde voie de contamination se fait à travers les excréments des animaux contaminés et le contact direct entre les animaux, par la voie dite oro-nasale entre individus sains et individus infectés. C'est le mode principal de contamination et de dissémination une fois le virus introduit dans le troupeau de porc domestique *Sus scrofa domesticus*, très sensible au virus.

En ce qui concerne les sangliers (*Sus scrofa scrofa*) et les porcs sauvages, dans les pays du Caucase et en Europe, ce sont des hôtes sensibles qui montrent tous deux des signes cliniques et un taux de mortalité similaire aux porcs domestiques (Bøtner *et al.*, 2010). Le risque lié au sanglier n'est pas négligeable à cause de la taille des populations forestières, de leur

répartition et de leur mode de vie. Certains sangliers sont capables de parcourir plusieurs dizaines de kilomètres par jour sur un territoire pouvant atteindre plusieurs centaines d'hectares (Boitani *et al.*, 1994). La taille des compagnies de sangliers peut être conséquente avec plus d'une trentaine d'individus (Jori & Bastos, 2009, Vassant *et al.*, 2010). Ils sont ainsi en mesure de propager facilement la maladie à travers des corridors reliant les populations infectées avec les animaux sensibles, dans des secteurs où les fermes ne bénéficient pas de conditions de biosécurité optimales (Mur *et al.*, 2014, Khomenko *et al.*, 2013).

E. Le vecteur

1. Les vecteurs suspectés :

Plusieurs espèces de vecteurs hématophages, ont été étudiées pour la transmission du virus de la PPA. Certaines se révèlent être en mesure de transmettre le virus de façon mécanique. Une bonne définition des caractéristiques que doit rencontrer ou avoir un vecteur mécanique est établie par (Mellor *et al.*, 1987) : le vecteur mécanique doit pouvoir transmettre le virus sur une courte période de temps sans le multiplier et avant de l'éliminer.

Parmi les vecteurs mécaniques de la PPA, on peut retrouver les tiques dures comme les *Amblyomma sp* et les *Rhipicephalus sp* (Plowright, 1977, Grocock *et al.*, 1980) qui peuvent transmettre le virus sur moins de 6 semaines sans multiplication et avec une disparition totale au-delà. Cependant, le cycle de développement de ces tiques (1 gorgement par stade de développement) fait que 2 gorgements successifs en 6 semaines est assez improbable dans la nature. Une récente étude a évalué la persistance du virus chez d'autres tiques dures *Ixodes ricinus* et *Dermacentor reticulatus*. Dans les 2 cas, il n'y a pas eu de preuve de multiplication du virus dans ces tiques. Les différentes souches virales étudiées sont toutefois encore détectables chez *I. ricinus* et dans quelques tiques de l'espèce *D. reticulatus* après 6 semaines avec une forte décroissance à partir de 3 semaines (de Carvalho Ferreira *et al.*, 2014). Toutefois, cette étude utilise une technique de détection du génome viral par qPCR et n'apporte pas de preuves sur la survie réelle du virus dans ces tiques.

Les autres vecteurs mécaniques possibles sont les triatomés (*Triatoma infestant*) (Hess *et al.*, 1987) qui transmettent le virus sur 20 jours et les mouches *Stomox* (Mellor *et al.*, 1987, Webb, 1990) qui le transmettent sur 48h, tout comme la mouche tsé-tsé et les moustiques anophèles (Rennie, 1998). Pour d'autres vecteurs tels que les poux, les études sont contradictoires (Sanchez & Badiola, 1966, Heuschele & Coggins, 1965). Enfin, d'autres vecteurs tels que les puces et les phlébotomes n'ont jamais été capables de transmettre le virus : (Vannier *et al.*, 2010, Bøtner *et al.*, 2010).

2. Les vecteurs et réservoirs avérés : les tiques du genre *Ornithodoros*

* Les espèces impliquées dans la transmission du virus de la PPA

Le rôle des tiques dans la transmission et le maintien de la PPA a été mis en évidence il y a plus de 50 ans (Plowright *et al.*, 1969a, Sanchez Botija, 1963). Ces tiques molles du genre *Ornithodoros* font partie de la famille des *Argasidae* et de l'ordre des *Ixodida*. Les espèces africaines *O. moubata* et *O. porcinus* ainsi que l'espèce ibérique *O. erraticus* ont fait l'objet de plusieurs publications qui étudient leurs implications dans l'épidémiologie de la maladie (Kleiboeker & Scoles, 2001). Ainsi, le virus vivant a été retrouvé après au moins 3 ans chez *O. moubata* (Plowright, 1977) et plus de 5 ans après chez *O. erraticus* (Boinas, 1994, Boinas *et al.*, 2011). L'espèce africaine *O. savignyi* a été étudiée en laboratoire et semble capable de transmettre le virus de la PPA. De l'ADN du virus a été retrouvé chez les espèces *O. sonrai* d'Afrique de l'ouest (Vial *et al.*, 2007) et *O. porcinus domesticus* de Madagascar (Ravaomana *et al.*, 2010) dans des études de terrain mais aucune étude n'a jamais évalué leur faculté à transmettre le virus. Les espèces américaines *O. coriaceus* et *O. turicata* ont fait l'objet d'expérimentations en laboratoire qui montrent des résultats positifs sur la transmission du virus au contraire de l'espèce *O. parkeri* (Hess *et.al.*, 1987). L'espèce caribéenne *O. puertoricensis* a été évaluée comme étant un bon vecteur du virus dans les années 90 suites aux épisodes de PPA en République Dominicaine et Haïti (Endris *et.al.*, 1991, Hess *et.al.*, 1987). Il n'y a pas de données sur les autres espèces d'*Ornithodoros*, cependant, à cause de sa répartition (Figure 8) et de son écologie (Vial, 2009), l'espèce caucasienne *O. asperus* est fortement suspectée de pouvoir s'infecter. Malheureusement, aucune recherche sur le terrain ou en laboratoire n'a été réalisée pour confirmer cela. Le risque lié aux autres espèces asiatiques et orientales susceptibles de rencontrer le virus est totalement inconnu à cause du peu de données fournies sur ces espèces.

* Confusion taxonomique et complexe d'espèces

Les récentes études phylogénétiques (Nava *et al.*, 2009, Guglielmone *et al.*, 2010) sur les tiques *Argasidae* mettent en évidence certaines confusions taxonomiques vis-à-vis des noms utilisés dans les études sur les tiques *Ornithodoros* et le virus de la PPA depuis les années 1960. Ainsi, l'espèce *O. maroccanus* est aujourd'hui reconnue comme une synonymie de l'espèce *O. erraticus*, nom qui sera utilisé dans la suite de ce manuscrit. La seconde confusion possible réside au sein du complexe d'espèces *O. moubata sensu lato* dont les espèces *O. moubata* et *O. porcinus* font partie. Il est extrêmement difficile de les différencier morphologiquement, mais elles ont des préférences écologiques différentes, et une analyse génétique peut permettre de les distinguer. Les espèces communément admises dans ce complexe d'espèces sont *O. moubata sensu stricto*, distribuée en Afrique australe et retrouvée à la fois dans la faune sauvage et domestique et *O. porcinus* retrouvée en Afrique de l'est. Cette espèce se distingue en 2 sous espèces : *O. porcinus porcinus* qui est la forme sauvage occupant principalement les terriers de suidés sauvages comme par exemple celui du phacochère, et *O. porcinus domesticus* qui est la forme domestique localisée préférentiellement dans les habitations (Walton, 1962, Walton, 1964). Beaucoup d'articles ne donnent pas suffisamment d'informations pour faire la distinction, aussi la seule distinction qui sera faite par la suite sera entre *O. moubata* et *O. porcinus*.

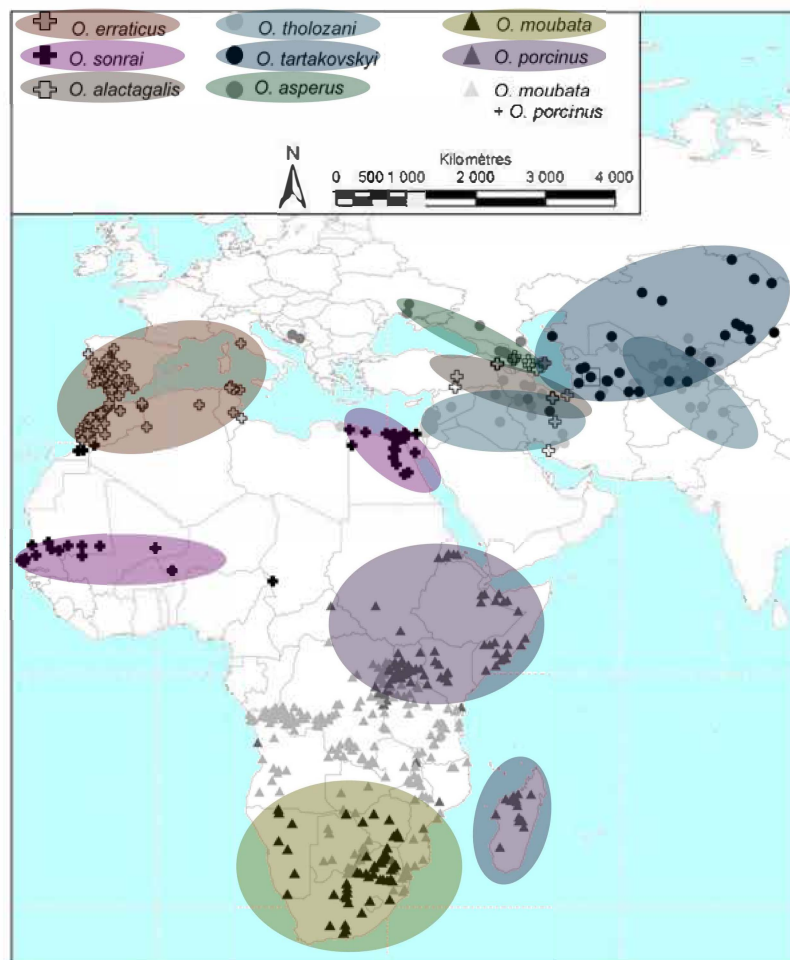


Figure 8 : Carte de répartition d'une partie des tiques *Ornithodoros* africaines, européennes, orientales et asiatiques. (Vial, 2009).

* Écologie

Au niveau des conditions de vie, les tiques du genre *Ornithodoros* sont des tiques nidicoles, et principalement endophiles pour celles impliquées dans la transmission du virus de la PPA. Elles sont localisées au fond des terriers de mammifères et de reptiles ou dans les fissures des habitations à l'abri de la lumière. Les populations de tiques peuvent être relativement importantes puisque Sonenshine en 1993 a estimé la population d'*O. porcinus* dans les terriers de phacochères à approximativement 250000 individus (Sonenshine, 1993). Suivant les espèces, elles sont retrouvées dans des régions où la gamme de température varie entre 18 et 30 °C, avec une humidité relative (RH) comprise entre 50 % et 90 %, avec un optimum autour de 25–28 °C et 75–85 % RH pour la majorité des espèces (Tableau 1) (Vial,

2009). Ces tiques ne présentent pas de préférence d'hôte, toutefois, au vu de leur faible mobilité et de leur caractère endophile, elles ont une certaine spécificité d'hôte à cause de leur spécificité d'habitat (par exemple les hommes et les animaux domestiques pour celles retrouvées dans les habitations).

Espèce / Sous-espèce	Optimum interne aux Micro-habitats		Diapause	Cycle de vie (jours) en conditions optimums		Distribution des données de terrain	Micro-habitat des données de terrain
	T (°C)	RH (%)		Min	Max		
<i>O. moubata</i>	25 [22–32]	50 [50–60]	?	36 (3–4 Ny)	113	Pluie < 500 mm Pas en altitude	Terriers de suidés/fissures des habitations
<i>O. p. porcinus</i>	25 [24–25]	83 [77–83]	Supposée en saison sèche			Pluie < 900- 1000 mm Pluie < 1250- 1500 mm Pas en altitude	Terriers de suidés
<i>O. p. domesticus</i> (race 1)	22 [17–26]	92 [72–96]				Altitude > 1500 m Altitude < 2100-3000 m Hautes Plaines	Habitation
<i>Opd</i> (race 2)	24 [20–27]	62 [50–96]				1200 < Alt > 1500 m	Habitation et poulaillers
<i>Opd</i> (race 3)	23 [22–27]	52 [50–55]				Alt > 1000 m Moyenne altitude	
<i>Opd</i> (race 4)	26 [20–31]	77 [67–96]				Niveau de la mer	Poulaillers
<i>O. erraticus</i> <i>O. sonrai</i>	30 [25–35]	90 [75–95]	Si T _{ext} trop faible (13-15 °C) 4-5 mois	51	158	50 < Pluie < 750 mm Pas en altitude	Terriers de rongeurs / fissures humides de terriers et d'habitation
<i>O. tholozani</i>	25 [16–29]	75 [70–80]	Si T _{ext} trop faible (5-8 °C) 6 mois	157	184	2500 < Pluie > 750 mm	Grottes et tanières/abris d'humains et de troupeaux
<i>O. tartakovskyi</i>	25 [16–29]	75 [70–80]	?	80	95	100 < Pluie < 300 mm Amplitude T° plus grande T° annuelle > 17 °C	Terriers de reptiles et petits mammifères
<i>O. asperus</i>	16 [15–18]	90 [80–100]	Si T _{ext} trop faible (Oct-juin) 4-5 mois	153	260	Moy pluie : 350 mm Max pluie > 500 mm Amplitude T° basse	Grottes ou terriers de reptiles ou petits mammifères

Tableau 1 : Exemples de conditions de vie de différentes espèces de tiques *Ornithodoros*.

La référence aux différentes races *O. p. domesticus* (*Opd*) est due à leur échantillonnage dans des sites aux caractéristiques écologiques différents. Alt : Altitude ; Ny : nymphe ; RH : humidité relative ; T : Température (Vial, 2009).

* Cycle de vie

Pour les 3 stades évolutifs : larves, plusieurs stades de nymphes et adultes, chaque évolution au stade supérieur nécessite un repas de sang (Figure 7). Le stade larvaire ne se gorge pas chez certaines espèces comme *O. moubata* et *O. porcinus*, mais il est nécessaire chez d'autres espèces telle qu'*O. erraticus* pour muer au stade nymphe 1 (Ny1). Chez les premières espèces, les larves sont presque immobiles à l'intérieur des membranes de l'œuf pendant environ 1 à 2 semaines et ne se dégagent qu'après la mue en Ny1, alors que chez *O. erraticus* elles sont très mobiles dès l'éclosion. On compte généralement entre 3 à 6 stades

nymphaux. La durée de chaque stade, incluant digestion et mue, entre 2 repas de sang, est d'environ 3 semaines pour les stades précoces (Ny1 à Ny3), et peut augmenter jusqu'à 5 semaines pour les derniers stades. Le stade adulte mâle apparaît après le stade Ny3 chez *O. moubata* et *O. porcinus* et quelques mâles muent encore après le stade Ny4 et Ny5, alors que la mue imaginale en femelle est réalisée après le stade Ny4 et plus. Il faut donc, dans de bonnes conditions de température et d'hygrométrie, entre 4 à 6 mois pour obtenir des adultes prêts à se reproduire. Le temps de gorgement est dépendant de l'espèce mais est en moyenne de moins d'une heure. Le gorgement déclenche l'excrétion de liquide coxal, provenant de glandes coxales situées entre les premières et secondes paires de pattes. L'excrétion se produit pendant le repas et se poursuit encore après pour les espèces *O. moubata* et *O. porcinus*, alors que pour d'autres comme l'espèce *O. erraticus*, il n'est observé qu'après la fin du gorgement, une fois que la tique est détachée de son hôte. Ce liquide sert à évacuer l'excédent d'eau des repas et est une voie supplémentaire de transmission du virus de la PPA en plus de celle constitué par la salive des tiques lors des repas.

Les tiques adultes se distinguent des autres stades d'une part par leur taille (Figure 9), généralement, les femelles sont nettement plus grandes que les mâles et les nymphes, mais surtout par des organes sexuels différenciés (Figure 10). La copulation des stades sexuels est préférentiellement réalisée lors d'un repas de sang ou juste après, ce repas étant nécessaire à la bonne maturation des œufs fécondés et à la production de nouveaux spermatophores pour les mâles (Sonenshine, 1991). Un seul spermatophore peut suffire à la femelle pour réaliser plusieurs pontes, mais plusieurs copulations par femelle sont souvent observées. Les femelles peuvent pondre jusqu'à 6 à 8 fois (respectivement *O. erraticus* et *O. moubata*), mais avec une baisse de la production d'œufs et du taux d'éclosion au cours du temps. La longévité est en moyenne de 2 à 3 ans, mais des études ont montré qu'elle pouvait atteindre parfois 5 à 8 ans (Sanchez Botija, 1963, Boinas, 1994).

La durée de chaque étape du cycle de développement est conditionnée d'une part par la qualité des repas sanguins (Mango & Galun, 1977) et d'autre part par les conditions environnementales, notamment la température (el Shoura, 1987). Ainsi, un repas de mauvaise qualité (ratio globules rouges/protéines/sérum non adéquat) ou de volume insuffisant, et/ou une température non adaptée, vont augmenter le nombre de mues nécessaires pour atteindre le stade adulte ainsi que le temps entre chaque mue et ponte. L'élevage de tiques dans des conditions de laboratoire, avec des gorgements artificiels sur membrane qui ne présenteront peut-être pas la même qualité, produit souvent un allongement du temps de développement.

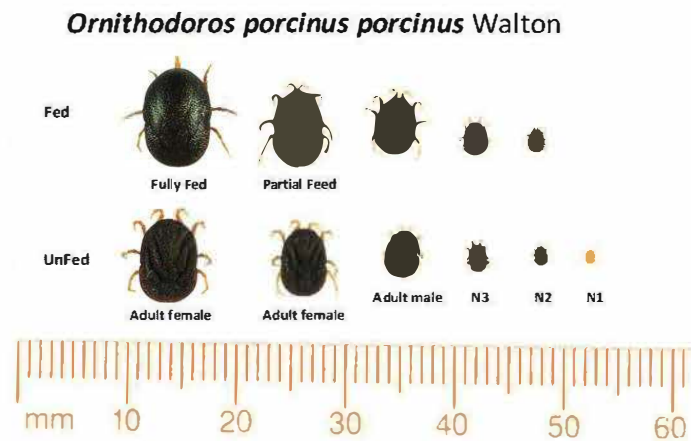


Figure 9 : Taille moyenne des différents stades des tiques *O. porcinus*.
Les femelles adultes gorgées sont environs 3 fois plus grosses que les non gorgées. (Burrage, 2013)

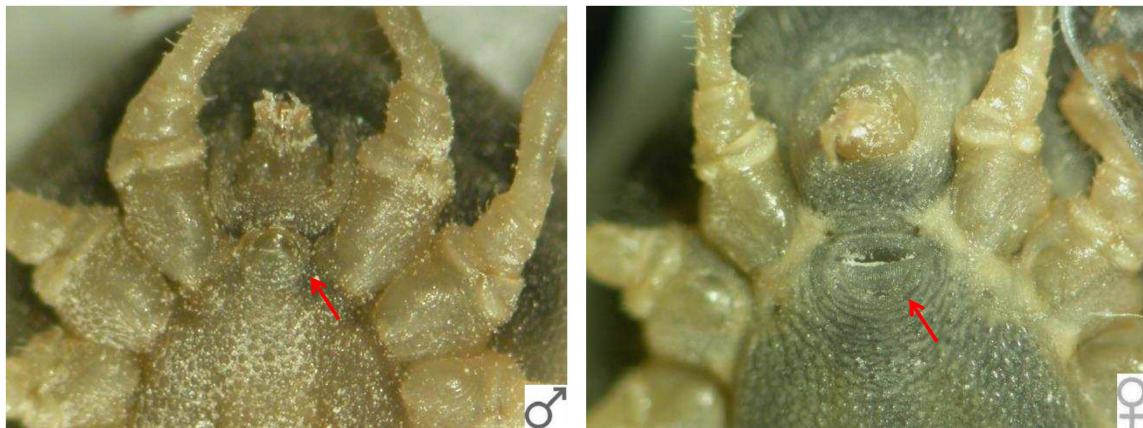


Figure 10 : organes sexuels des tiques *O. moubata*, mâle à gauche et femelle à droite (J. Bernard).

F. Pourquoi la compétence vectorielle des tiques *Ornithodoros* ?

Comme nous l'avons montré dans cette introduction, les interactions hôte-vecteur-parasite sont complexes à évaluer dans leur ensemble car elles font intervenir différentes échelles spatio-temporelles à prendre en compte. Le modèle d'étude du virus de la PPA - porc domestique - tique *Ornithodoros* en est un bon exemple. Il permet d'aborder les questionnements sur une échelle spatiale : allant de l'expansion géographique du virus grâce à sa résistance à l'environnement jusqu'à l'interaction cellulaire qu'il met en œuvre lors de l'infection des suidés et de son vecteur tique. L'étude de l'échelle temporelle est tout aussi intéressante puisqu'elle peut être considérée à travers la transmission directe du virus entre suidés ou lors de repas de sang des tiques *versus* la persistance au long terme du virus dans les tiques à travers différentes transmissions au sein de la population de tique.

Bien que la PPA soit majoritairement une maladie contagieuse à transmission directe, la transmission vectorielle est importante car elle intervient dans deux des trois cycles de transmission et permet le maintien du virus sur le long terme ainsi que la résurgence des foyers épidémiques. De plus, les conditions d'éradication et de contrôle de la maladie sont différentes et plus drastiques en cas de transmission vectorielle. En effet, les recommandations de l'OIE préconisent de ne pas réintroduire de porcs dans des fermes infestées par des tiques après une épidémie de PPA pendant 8 ans, alors que les fermes non infectées par les tiques ont une recommandation de 3 ans. L'utilisation de torches enflammées semble être le moyen le plus efficace pour désinfecter les locaux des tiques selon un questionnaire réalisé auprès de fermiers au Portugal, suivie ensuite par l'utilisation d'acaricides (Boinas, 1994). Cependant, plusieurs passages sont souvent nécessaires dans certains endroits présentant de multiples anfractuosités, afin de décontaminer correctement les locaux. La ferme malgache utilisée pour l'échantillonnage des tiques de la publication de Ravaomanana (Ravaomanana *et al.*, 2010) a dû subir 3 décontaminations par acaricide (formulation aqueuse de cyperméthrine) avant l'élimination des tiques (Ravaomanana *et al.*, 2011).

À cause du manque substantiel de connaissances sur ce modèle, notamment en ce qui concerne l'implication des tiques (distribution géographique, biologie, mais surtout aptitude à transmettre le virus de la PPA), il n'est pour le moment pas possible d'anticiper correctement leur impact. On comprend mieux ainsi pourquoi il est important de pouvoir caractériser la compétence vectorielle des tiques *Ornithodoros* pour le virus de la PPA

Chapitre 1 : caractérisation de la compétence vectorielle des tiques du genre *Ornithodoros* pour le virus de la peste porcine africaine

À cause de leur implication dans la ré-émergence des foyers de PPA, mieux connaître le rôle des tiques *Ornithodoros* dans les cycles de transmission du virus se révèle important pour le contrôle de la maladie. À cet égard, l'une des composantes majeures à étudier est la compétence vectorielle. L'objectif de ce chapitre est d'essayer de répondre à trois questions essentielles :

- Comment étudier et tester la compétence vectorielle des tiques *Ornithodoros* pour le virus de la PPA ?
- Que connaît-on sur l'état de l'art concernant l'étude de la compétence vectorielle des tiques *Ornithodoros* pour le virus de la PPA ?
- Existe-t-il des patrons généraux de cette compétence, communs aux différents couples espèce de tique-souche virale déjà étudiés ?

Après avoir décrit précisément ce que l'on entend par compétence vectorielle, une revue exhaustive sur les 50 dernières années des travaux traitant de la compétence vectorielle des tiques *Ornithodoros* pour le virus de la PPA a été réalisée.

Le résultat de cette revue a été présenté en deux parties. La première partie porte sur la comparaison et l'évaluation des méthodes utilisées pour étudier cette compétence vectorielle. En tenant compte des biais inhérents à la méthodologie, la seconde partie présente quant à elle les patrons généraux de compétence vectorielle au travers de la description des mécanismes sous-jacents à chaque étape de la compétence, à la fois par l'analyse des grandes tendances et aussi par l'observation au cas par cas des couples espèce de tique *Ornithodoros* –souche virale de la PPA (simplifié dans la suite du manuscrit par couple tique–virus).

Deux questions sont au final posées :

- i) Est-il possible de comparer les différentes études testant la compétence vectorielle des tiques molles pour le virus de la PPA afin de préciser les patrons généraux de compétence ?
- ii) Comment, à partir de l'analyse des méthodes d'étude classiquement utilisées, peut-on être en mesure de proposer des méthodes standardisées pour tester expérimentalement et de façon la plus optimale possible la compétence vectorielle des tiques molles pour le virus de la PPA ?

I. Capacité vectorielle versus compétence vectorielle

Lorsque l'on étudie les interactions hôte-parasite-vecteur, on s'intéresse aux notions de capacité vectorielle et de compétence vectorielle, qui se révèlent être étroitement liées.

La capacité vectorielle constitue un indicateur du risque de transmission du parasite. Elle représente le nombre de piqûres/morsures potentiellement infectantes qu'un seul vecteur peut générer sur un temps donné (Tran *et al.*, 2005). Entrent en compte dans l'étude de la capacité vectorielle tous les facteurs intrinsèques et extrinsèques qui peuvent agir sur le risque de transmission du parasite par le vecteur (Dye, 1992) (Figure 11). Ainsi sont par exemple considérés :

i) Chez le vecteur : les caractéristiques de longévité à la fois de l'individu et de la population pour assurer la survie du parasite jusqu'à la prochaine transmission, la probabilité pour le vecteur de s'infecter et de devenir infectant, la densité de la population de vecteurs ainsi que la prévalence d'infection au sein de cette population ; ou encore, les interactions du vecteur avec son hôte, entre autres ses préférences trophiques, la fréquence de gorgement ou encore sa résistance au comportement d'évitement et au système immunitaire de l'hôte.

ii) Chez l'hôte : sa probabilité de rencontre avec le vecteur, sa dynamique de population et son abondance, sa résistance au parasite et au vecteur.

iii) Chez le parasite : principalement sa période d'incubation extrinsèque correspondant au temps nécessaire au parasite pour infecter le vecteur et s'y développer, son taux de mutation ou encore sa virulence envers l'hôte et/ou le vecteur.

Enfin, l'environnement doit aussi être appréhendé à travers l'influence des facteurs abiotiques ou écologiques qui vont agir sur la physiologie ou la biologie des trois protagonistes du cercle de transmission (Gillespie *et al.*, 2004).

L'étude de la capacité vectorielle est donc une notion très large qui est estimée à partir de paramètres mesurés sur le terrain et parfois complétés par des tests en laboratoire. Cependant, en raison des nombreux paramètres et des différentes échelles de temps et d'espace sur lesquels repose la capacité vectorielle, l'interprétation des indices de risque final est délicate et difficilement transposable d'une étude à l'autre (Tran *et al.*, 2005).

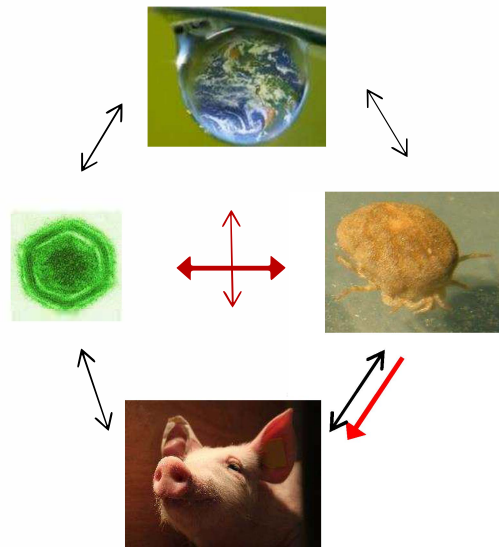


Figure 11 : schéma représentant les interactions existantes entre les différents protagonistes lors d'une transmission vectorielle.

L'environnement est en haut, le vecteur à droite, l'hôte en bas et le parasite à gauche. Chacun est susceptible d'influencer la capacité vectorielle. Les flèches rouges représentent les interactions classiquement étudiées dans le cadre de la compétence vectorielle.

La compétence vectorielle est une notion plus restreinte, comprise dans l'étude de la capacité vectorielle. Elle est plus facilement évaluable et fournit des données très précieuses pour les modèles d'évaluation des risques. La compétence vectorielle ne considère que le vecteur et le parasite et peut être définie comme la possibilité innée du vecteur à acquérir le parasite et le transmettre avec succès à un autre hôte susceptible, généralement seule la transmission à des hôtes vertébrés est considérée dans la définition d'hôte susceptible.

N'ayant pas trouvé dans la bibliographie d'indications contraires, j'ai choisi dans la suite de ce manuscrit de considérer que la transmission à tout hôte capable de continuer le cycle épidémiologique du parasite, vertébré ou arthropode, ferait partie de cette définition. Au final, elle comprend donc 3 étapes : l'infection du vecteur, le maintien et/ou la multiplication du parasite dans le vecteur et enfin la transmission du parasite à un hôte susceptible.

Chacune de ces étapes repose sur une série de processus biologiques au sein du vecteur d'arthropode : l'infection du vecteur par le parasite nécessite la traversée de la barrière intestinale de l'arthropode, la persistance du parasite dans l'arthropode nécessite sa multiplication en dépit de la réponse immunitaire de vecteur, et enfin la transmission finale du parasite à un hôte nécessite de nouveau le franchissement de barrières anatomiques pour passer dans les organes impliqués dans la transmission.

Le vecteur et le parasite étant en étroite collaboration, la compétence vectorielle est influencée par des facteurs internes (intrinsèques) au vecteur et au parasite relevant des caractéristiques génétiques de ces derniers et agissant sur leurs métabolismes et leurs physiologies. Dès lors, il est possible de comprendre que la compétence vectorielle résulte d'une co-adaptation forte entre le parasite et son vecteur et que chaque mesure de compétence sera spécifique à chaque couple vecteur-parasite. Ces derniers évoluant ensemble dans un environnement donné, un petit nombre de paramètres environnementaux peuvent donc influencer certains paramètres de la compétence vectorielle en tant que facteur extrinsèque. Par exemple, en raison de son influence sur la multiplication des parasites à l'intérieur de leur vecteur arthropode hétérotherme et/ou directement sur la biologie du vecteur et donc sa capacité à multiplier le parasite, la température ambiante peut faire partie des paramètres à prendre en compte (Gale *et al.*, 2009, Kilpatrick *et al.*, 2008, Weaver, 2004). Un autre facteur souvent suspecté pour avoir une influence directe sur la compétence vectorielle serait le microbiome des vecteurs, c'est-à-dire l'ensemble des micro-organismes présents dans le tube digestif et l'hémolymphe du vecteur, lieux de passage et de multiplication des parasites transmis (Jupatanakul *et al.*, 2014). Enfin, parce que l'hygrométrie est un paramètre important influençant aussi le métabolisme des arthropodes, certains auteurs proposent l'effet de l'humidité relative comme facteur pouvant influencer la compétence vectorielle (Fokunang *et al.*, 2004, Tong & Hu, 2001).

D'après sa définition, la compétence vectorielle se caractérise *a priori* de manière qualitative ; un vecteur est compétent ou ne l'est pas. Cependant, elle est composée de plusieurs étapes : infection, multiplication et transmission, et toutes ces étapes ne sont pas forcément effectives. En outre, en raison des variabilités interindividuelles, la caractérisation de la compétence passe par la reproduction des essais ou l'augmentation de l'échantillonnage sur le terrain et aboutira à des mesures finalement quantitatives plus représentatives de la réalité, par exemple le taux de vecteurs réussissant à s'infecter sur un hôte vertébré contaminé. Enfin, individuellement, la compétence vectorielle peut aussi se mesurer à l'aide de paramètres intrinsèquement quantitatifs, tels que la charge parasitaire dans le vecteur ou dans ses excréments, ainsi que le temps nécessaire au parasite pour infecter le vecteur ou la durée de la période sur laquelle il peut être transmis. Pour toutes ces raisons, les résultats obtenus refléteront une certaine gradation dans l'évaluation de la compétence vectorielle et non une simple réponse oui/non.

II. Matériel et méthodes pour l'analyse bibliographique

La méthodologie utilisée dans ce chapitre a été empruntée au domaine de la santé et du soin où elle est couramment utilisée pour compiler et synthétiser de nombreux résultats provenant d'études réalisées dans des conditions et contextes différents. Elle se base sur l'évaluation de l'ensemble des recherches primaires répondant à certains critères prédéfinis, pour en tirer une base de réflexion commune, avec la possibilité d'une validation par un panel d'experts (<http://www.cochrane.org/fr/what-is-cochrane-evidence>) (Turner *et al.*, 2012, Dersch *et al.*, 2014).

A. Stratégie de recherche des ressources bibliographiques

Les bases de données suivantes ont été utilisées jusqu'en Avril 2015 pour chercher des ressources de la littérature en langue anglaise répondant aux mots-clés "African swine fever" ET "Tick" : Ethos (<http://ethos.bl.uk/Home.do>), PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) et Scopus (<http://www.scopus.com/>) (Figure 12). En outre, les références citées à la fin des documents de référence ont été vérifiées, afin d'identifier l'existence d'autres études pertinentes. Aucune limitation dans le genre de la littérature (grise et blanche), l'année de publication, ou l'origine géographique du matériel (tique et virus) n'a été définie. Les doublons entre les différents outils de recherche ont été retirés.

B. Critères de sélection des ressources de références

Seules les ressources qui présentaient des résultats originaux et significatifs, approuvées par un comité de lecture scientifique (articles et thèses), ont été incluses. Les rapports de stage, les communications de congrès, ou les avis purement descriptifs sans analyse de données ont été éliminés. Les documents traitant de sujets non directement liés à la compétence vectorielle, tels que la prévalence d'infection chez les tiques, les stratégies de contrôle de tiques, la salive des tiques, la biologie et l'écologie des tiques, ainsi que l'épidémiologie générale de la maladie, la génétique, la pathogénèse et la virulence ont également été rejetées (Figure 12). Seuls les articles qui décrivaient et analysaient des données originales sur au moins une étape de la compétence vectorielle ont été retenus. Le seul critère d'exclusion portait sur l'absence d'une information essentielle à l'évaluation de la compétence vectorielle : la date à laquelle l'infection des tiques avait été réalisée ou encore la durée entre l'infection des tiques et les résultats de compétence vectorielle. Les articles

ainsi rejetés ont toutefois pu être utilisés pour étayer la description des patrons de compétence vectorielle.

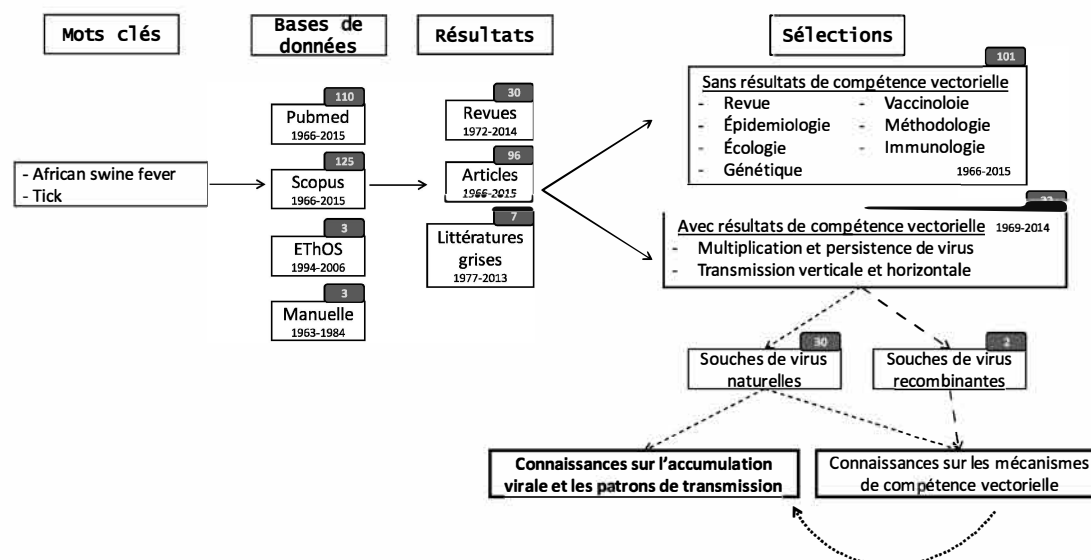


Figure 12 : Organigramme de la sélection des ressources bibliographiques de référence.

La première rangée de gauche indique les mots clés utilisés pour la recherche. La deuxième colonne présente les résultats obtenus à partir de chaque base de données ainsi que l'échelle des dates de publications, en utilisant les mots clés précédents. La troisième colonne indique la répartition par type de ressource bibliographique. La dernière colonne à droite montre comment la sélection des documents de référence a finalement été réalisée et indique surtout la typologie de ces ressources bibliographiques. Les nombres en gris foncé au-dessus de chaque case correspond au nombre de documents de la littérature retrouvés dans chaque sélection. Parce que certains documents traitent de plusieurs critères en même temps, la somme des documents selon ces différents critères peut correspondre à plus de 100% des documents.

C. Évaluation de la qualité des ressources et des risques de biais

Aucune étude n'a été exclue sur la base de sa qualité, en raison de la rareté des documents disponibles sur la compétence vectorielle des tiques *Ornithodoros* pour le virus de la PPA. Cependant, différents critères de qualité pourraient influencer les résultats et être définis dans l'idéal. Choisir des dates de publication suffisamment récentes, ou réaliser une sélection sur des contraintes méthodologiques utilisées pour infecter les tiques ou suivre leur infection, auraient pu en effet assurer une meilleure homogénéité entre les études. Des biais peuvent aussi exister, en fonction de la gestion des données manquantes ou incomplètes. Dans les

ressources bibliographiques étudiées, certaines informations manquaient parfois, ou étaient incertaines, concernant l'identité des souches du virus de la PPA utilisées ou celle des espèces de tiques infectées. Pour les tiques, lors de dénominations douteuses, des changements ont été effectués selon la nomenclature actuellement acceptée pour les tiques molles (Guglielmone *et al.*, 2010). Ainsi, *O. maroccanus* a été renommée *O. erraticus*. Face aux doutes persistants concernant le complexe d'espèce *O. moubata sensu lato*, certains transferts entre *O. moubata* and *O. porcinus* ont été effectués en accord avec les cartes de distribution connues pour ces deux espèces (Morel, 2003, Vial, 2009). Concernant les souches virales utilisées, une enquête de vérification a été menée en croisant les publications issues des mêmes auteurs à la même période et en contactant parfois directement les auteurs. De cette manière, l'origine et le nom correct de la plupart des souches de virus ont été récupérés, en accord avec ceux déposés dans les bases de données officielles tel que GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) ou celle du laboratoire européen de référence de la PPA (<http://asf-referencelab.info/asf/en/sequence-data-base>). Par exemple, les articles du Tableau 2 p60, n°29, 30 et 31 semblaient utiliser la même souche de virus de la PPA. Les auteurs ont collaboré dans les années 1970 et ont mentionné la même référence « Detray, 1963 » pour l'origine de la souche (Detray, 1963). L'article de Detray en question signale à ce sujet un phacochère infecté, chassé en 1961 en Ouganda, d'où notre choix d'utiliser la désignation commune de « Uganda/61 » pour cette souche. Si par contre un doute subsistait, l'ancien nom utilisé par les auteurs était maintenu. Et lorsqu'aucun nom n'était fourni par l'auteur, un nom *a priori* a été attribué en indiquant le pays où la souche du virus de la PPA a été isolée, l'année de l'étude, et une lettre si des doublons apparaissaient. Par exemple, la souche Zimbabwe/83/a de l'article n°22 correspond à un ensemble possible de souches zimbabwéennes recueillies en Novembre 1983 à Victoria Falls, dans la station de quarantaine Mbezi et Chiredzi, tandis que la souche Zimbabwe/83/b de l'article n°23 correspond à une souche zimbabwéenne également recueillie en 1983, mais sans aucune information pour confirmer sa ressemblance avec la première. Enfin, lorsque plusieurs souches provenaient de la même origine, mais à des moments différents et n'étaient pas détaillées par les auteurs, un nom générique a été donné, comme OUR ou MART dans les articles n°3 et 15.

D. Données méthodologiques issues des ressources bibliographiques de références

Les informations générales des articles de références, essentiellement les auteurs et l'année de publication, ont été recueillies pour essayer d'évaluer l'intérêt général porté à la compétence vectorielle des tiques *Ornithodoros* pour le virus de la PPA à travers le temps et pour identifier les différents groupes d'experts suivant les périodes.

Les informations sur les souches du virus de la PPA et les espèces de tiques testées ont été systématiquement rapportées. Pour le virus, l'origine géographique, l'hôte d'origine (tique, porc, phacochère, ou virus recombinant) et le génotype (de I à XXII) ont été rapportés. Pour les tiques, l'origine géographique et le statut de la colonie utilisée pour les expériences (tiques de terrain, colonie de laboratoire de moins de 5 ans, colonie entre 5 et 10 ans, et colonie de plus de 10 ans) ont été retenus.

La méthodologie utilisée pour chaque étape de la compétence vectorielle a également été rapportée, incluant : i) les techniques de gorgement sur sang utilisées pour infecter les tiques et pour le maintien des tiques infectées (gorgement sur porcs sur le terrain ou expérimentalement en laboratoire, gorgement sur membrane artificielle, gorgement par capillaires placés sur des pièces buccales de tiques, ou infection par une inoculation de culture virale à la seringue), ii) le titre de virus dans le repas de sang infectieux (faible titre inférieur à 10^4 HAD₅₀/mL, titre moyen de 10^4 à 10^6 HAD₅₀/mL, fort titre supérieur à 10^6 HAD₅₀/mL), iii) les stades de développement de tiques utilisés pour l'expérience et/ou la surveillance (larves = Lv, différents stades de nymphes = Ny suivi d'un n°, ou adultes = Ad), iv) les conditions de maintien des tiques (en groupe ou individuel, présence ou absence de repas de sang supplémentaires), et v) la durée du maintien de la tique après le repas de sang infectieux (moins de 60 jpi, 61 à 181 jpi, de plus de 182 jpi).

En outre, les différentes techniques utilisées pour la détection de virus et sa quantification dans des tiques, ainsi que pour évaluer la transmission du virus, ont également été rapportées (immunofluorescence directe, titrage du virus, PCR, RT-PCR, et/ou l'observation des signes cliniques de la maladie chez les porcs après morsure de tiques).

Enfin, nous avons rapporté de tous les articles de référence les mesures utilisées par les auteurs pour évaluer la compétence vectorielle des tiques. Contrairement à d'autres informations d'ordre méthodologique, ces mesures de la compétence vectorielle ont été signalées en termes de proportion des couples tique-virus à la place du nombre d'articles, parce qu'elles caractérisent la faculté d'une espèce de tique *Ornithodoros* à maintenir et/ou

transmettre une souche de virus de la PPA. Cependant, dans ces couples tique-virus, les résultats des tiques provenant de colonies avec des statuts différents ont été rassemblés. En outre, l'utilisation de différentes méthodes pour infecter et suivre les tiques a parfois été observée au sein d'un même article, selon les différents objectifs et questions posées. Ainsi, la somme des proportions des méthodes utilisées peut être supérieure à 32/32.

E. Données de compétences issues des ressources bibliographiques de référence

Les données permettant de caractériser la compétence vectorielle des tiques *Ornithodoros* pour le virus de la PPA ont été obtenues à partir des ressources bibliographiques de référence mais aussi grâce aux quelques synthèses publiées notamment par (Plowright, 1977, Plowright, 1994, Kleiboeker & Scoles, 2001, Burrage, 2013) ainsi que les rapports scientifiques de l'EFSA mis à jour en 2014 (EFSA, 2014). Toutefois, ces ressources n'apportent pas de données chiffrées sur la compétence mais sont utiles pour décrire les mécanismes sous-jacents à la compétence vectorielle.

Bien que la compétence vectorielle semble être une caractéristique propre à chaque couple tique-virus, les mécanismes sous-jacents de cette compétence sont souvent similaires et peuvent donc être décrits dans leur globalité. En outre, par l'accumulation de données spécifiques et dans le cas où les conditions pour les acquérir sont comparables, il est possible de déterminer certains seuils de compétence comme par exemple des intervalles de temps ou des titres viraux, cohérents et représentatifs de l'ensemble des couples tique-virus étudiés. Donc, les résultats concernant cette partie seront plutôt donnés sous forme d'une synthèse bibliographique classique, intégrant au besoin des données chiffrées issues des publications de référence.

Concernant la cinétique d'infection dans la tique, c'est-à-dire la propagation et la multiplication du virus au cours du temps dans la tique, les données sur les titres viraux ont été répertoriées pour tous les articles de référence à tous les temps de l'expérience, afin d'obtenir une courbe brute de cinétique pour chaque couple tique-virus et par titre viral dans le sang infectieux. Seules les données des tiques positives sont prises en compte pour ne pas biaiser la moyenne d'infection. Toutefois, très peu d'auteurs précisent la raison pour laquelle ils n'ont pas considéré certaines tiques dans leurs résultats (tique morte ou tique non infectée ?). Par conséquent, l'utilisation des taux d'infections obtenus de ces données de cinétique sont à relativiser.

L'utilisation des courbes brutes de cinétique est cependant difficile à interpréter (Annexe 1) à cause des grandes variations du titre viral retrouvées au sein d'une même population de tiques au cours du temps et probablement dues aux aléas d'échantillonnage, puisqu'à chaque intervalle de temps, des tiques différentes sont testées. Par contre, l'analyse des courbes de tendance exponentielle (Figure 15) issues de ces cinétiques brutes peut permettre de visualiser plus simplement l'évolution de la multiplication virale dans la tique et d'identifier quelques patrons communs à plusieurs couples tique-virus. Parfois, il a été possible de trouver des données plus précises des étapes d'infection organe par organe (Figure 14) dans deux publications chez l'espèce *O. porcinus* (Greig, 1972a, Kleiboeker *et al.*, 1998) et deux publications chez *O. moubata* (Burrage, 2013, Rennie, 1998). Compte-tenu de leur faible nombre, ces données restent essentiellement indicatives et ne peuvent pas être généralisables à tous les couples tique-virus.

F. Analyse synthétique des données de compétence

En accord avec les revues de Kleiboeker (Kleiboeker & Scoles, 2001) et Burrage (Burrage, 2013) sur les mécanismes d'entrée du virus, de sa dissémination dans les tiques, et de sa transmission par les tiques, différents scénarios reflétant un degré de compétence vectorielle ont été réalisés. L'analyse de l'ensemble des articles de référence a permis de définir des seuils, entre autres de durée, pour passer d'un scénario à un autre. Puis, un scénario a été attribué à chaque couple tique-virus étudié dans les articles de référence. L'objectif était de produire une mesure synthétique de compétence vectorielle pour chaque couple tique-virus et de voir si certaines « méthodologies d'étude » pouvaient influencer cette compétence. Comme certains couples tique-virus étaient étudiés dans plusieurs articles de référence, sur différentes périodes de temps, et/ou en utilisant différentes mesures de la compétence vectorielle (Annexe 2), nous avons décidé d'attribuer pour un couple tique-virus le scénario donnant le résultat de compétence le plus complet possible (période de suivi la plus longue et meilleure performance de compétence vectorielle).

III. Résultats d'analyse des articles de référence sur la compétence vectorielle des tiques *Ornithodoros* pour le virus de la PPA

A. Sélection et typologie des articles de référence

La recherche initiale a généré 110 références avec Pubmed et 125 par Scopus, avec 78,19 % de congruence. La base de données des manuscrits de thèse nommée ETHOS et notre bibliographie manuelle a permis d'identifier 10 ressources supplémentaires. Parmi les 140 ressources finales, 23,6 % étaient des revues, 71,4% des articles scientifiques et 5% de la littérature grise. Certaines références ont été supprimées directement suite à la lecture de leur résumé, d'autres après lecture intégrale du texte pour évaluer leur fiabilité en ce qui concerne les critères de sélection et décider ainsi de leur éligibilité. Au final, 32 publications correspondaient aux critères de recherche et indiquaient une origine datée de l'infection pour l'étude de la compétence vectorielle. Ils ont été numérotés de 1 à 32 par année décroissante dans le Tableau 2. Seulement 7 études de terrain ont été choisies parce qu'elles mentionnaient la date du prélèvement ou une date approximative depuis l'apparition de l'infection. Par exemple, dans le document n°28 qui a été inclus dans l'étude, la surveillance a été menée pendant 2 ans après une épidémie de PPA, de 1983 à 1985, et l'auteur a précisé qu'il n'y avait pas de porcs infectés au cours de la surveillance et qu'aucun contact avec des animaux infectés n'avait eu lieu dans les villages surveillés après 1983. À l'inverse, les articles de Plowright (Plowright, 1977) et Thomson (Thomson *et al.* 1983) ont été retirés parce que les auteurs échantillonnaient des tiques dans des terriers de phacochères sans informations sur la date possible de l'infection. Ces articles sont cependant pertinents pour fournir des éléments de preuve que l'infection des tiques est possible et permettent d'informer sur la prévalence du virus de la PPA dans les tiques, mais ne donnent aucun résultat exploitable en compétence vectorielle. Parmi les 7 articles sur le terrain, 5/7 ont consisté en un suivi de l'infection des tiques de terrain, et 2/7 ont combiné des enquêtes de terrain et des expériences en laboratoire. Les 25/32 autres articles de référence ont réalisé des expériences de laboratoire sur les tiques, dont 2 articles utilisant aussi des souches recombinantes de virus de la PPA.

Par l'analyse des dates de publication des articles de référence, on observe que le nombre de publications concernant la compétence vectorielle pour le virus de la PPA est relativement stable au cours du temps, tandis que le nombre total de documents liés à l'étude des tiques et du virus de la PPA a lui régulièrement augmenté depuis les années 1970 à nos jours (Figure 13). Soixante auteurs ont participé aux 32 articles sélectionnés. Seuls 33 sont premiers et/ou derniers auteurs. Ces scientifiques peuvent donc être considérés comme des « experts » dans

l'étude de la compétence vectorielle des tiques pour le virus de la PPA. La plupart d'entre eux ont également publié d'autres articles sur le virus de la PPA et les tiques molles, qui sont inclus dans les 140 articles originaux récoltés. Leur durée d'expertise est représentée dans la figure 13. Après 2005, 16/33 experts publient encore dans le domaine et peuvent être considérés comme le panel d'experts actuel.

B. Données méthodologiques

1. Espèces de tiques et souches virales testées (Tableau 3).

* Les tiques *Ornithodoros* :

Neuf espèces de tiques ont été étudiées quant à leur compétence vectorielle pour le virus de la PPA. La plupart des auteurs n'ont testé qu'une espèce par publication, sauf Hess qui a testé 2 espèces dans l'article n°22 et 4 espèces dans l'article n°24. Les tiques du complexe d'espèce *O. moubata* ont été les plus étudiées (16/32, incluant *O. porcinus* et *O. moubata sensu stricto*). *O. erraticus* a été moins souvent étudiée, dans seulement 10/32 articles, puis on retrouve les autres espèces (*O. sonrai*, *O. coriaceus*, *O. puertoricensis*, *O. turicata*, *O. parkeri* and *O. savignyi*) avec 1 à 3 articles pour chacune d'entre elles.

Les statuts des colonies de tiques utilisées pour les expériences sont assez diversifiés, allant de tiques directement échantillonnées sur le terrain à de très vieilles colonies maintenues en laboratoire depuis plusieurs décennies. Des tiques échantillonnées directement du terrain ont été utilisées dans 9/32 articles, en particulier l'espèce *O. erraticus*, puis dans une moindre mesure les espèces *O. moubata* et *O. porcinus*. Des tiques de terrain ont été utilisées en complément de tiques de laboratoire dans 4/32 autres articles. La gamme d'âge des colonies de laboratoire s'étend de 2 ans, pour l'article n°23, à 25 ans pour *O. turicata* dans l'article n°24.

L'origine géographique des colonies de tiques a pu être identifiée pour 24/32 articles. Pour l'espèce *O. erraticus*, toutes les tiques provenaient du Portugal, essentiellement de la région d'Alentejo. Au contraire, les espèces de tiques *O. moubata* et *O. porcinus* provenaient de nombreux pays différents, reflétant leur aire de distribution s'étendant de l'Afrique de l'est à l'Afrique du Sud. Pour 8 articles, il n'a pas été possible de retracer l'origine des colonies, ni leur âge, parce que les auteurs donnaient seulement le nom du laboratoire qui leur avait fournis la colonie (par exemple, dans l'article n°1 où les tiques *O. moubata* proviennent de l'Université Hadassah Medical School de Jérusalem).

N°	Articles sélectionnés
1	de Carvalho Ferreira HC, Tudela Zúquete S, Wijnveld M, Weesendorp E, Jongejan F, Stegeman A, Loeffen WL. No evidence of African swine fever virus replication in hard Tiques. Tiques Tique Borne Dis. 2014 Sep;5(5):582-9.
2	Diaz AV, Netherton CL, Dixon LK, Wilson AJ. African swine fever virus strain Georgia 2007/1 in <i>Ornithodoros erraticus</i> Tiques. Emerg Infect Dis. 2012 Jun;18(6):1026-8.
3	Boinas FS, Wilson AJ, Hutchings GH, Martins C, Dixon LJ. The persistence of African swine fever virus in Terrain-infected <i>Ornithodoros erraticus</i> during the ASF endemic period in Portugal. PLoS One. 2011;6(5):e20383.
4	Ravaomanana J, Michaud V, Jori F, Andriatsimahavandy A, Roger F, Albina E, Vial L. First detection of African Swine Fever Virus in <i>Ornithodoros porcinus</i> in Madagascar and new insights into Tique distribution and taxonomy. Parasit Vectors. 2010 Nov 30;3:115.
5	Rowlands RJ, Duarte MM, Boinas F, Hutchings G, Dixon LK. The CD2v protein enhances African swine fever virus replication in the Tique vector, <i>Ornithodoros erraticus</i> . Virology. 2009 Oct 25;393(2):319-28.
6	Vial L, Wieland B, Jori F, Etter E, Dixon L, Roger F. African swine fever virus DNA in soft Tiques, Senegal. Emerg Infect Dis. 2007 Dec;13(12):1928-31.
7	Basto AP, Nix RJ, Boinas F, Mendes S, Silva MJ, Cartaxeiro C, Portugal RS, Leitão A, Dixon LK, Martins C. Kinetics of African swine fever virus infection in <i>Ornithodoros erraticus</i> Tiques. J Gen Virol. 2006 Jul;87(Pt 7):1863-71.
8	Nix-Rowlands RJ. Interaction of ASFV with its Tique vector. PhD thesis manuscript. 2006.
9	Burrage TG, Lu Z, Neilan JG, Rock DL, Zsak L. African swine fever virus multigene family 360 genes affect virus replication and generalization of infection in <i>Ornithodoros porcinus</i> Tiques. J Virol. 2004 Mar;78(5):2445-53.
10	Rennie L, Wilkinson PJ, Mellor PS. Transovarial transmission of African swine fever virus in the argasid Tique <i>Ornithodoros moubata</i> . Med Vet Entomol. 2001 Jun;15(2):140-6.
11	Rennie L, Wilkinson PJ, Mellor PS. Effects of infection of the Tique <i>Ornithodoros moubata</i> with African swine fever virus. Med Vet Entomol. 2000 Dec;14(4):355-60.
12	Kleiboeker SB, Scoles GA, Burrage TG, Sur J. African swine fever virus replication in the midgut epithelium is required for infection of <i>Ornithodoros</i> Tiques. J Virol. 1999 Oct;73(10):8587-98.
13	Kleiboeker SB, Burrage TG, Scoles GA, Fish D, Rock DL. African swine fever virus infection in the argasid host, <i>Ornithodoros porcinus porcinus</i> . J Virol. 1998 Mar;72(3):1711-24.
14	Rennie L. The Persistence of African swine fever virus in the Argasid Tique <i>Ornithodoros moubata</i> . PhD thesis manuscript. 1998.
15	Boinas FS. The role of <i>Ornithodoros erraticus</i> in the epidemiology of ASFV in Portugal. PhD thesis manuscript. 1994
16	Endris RG, Hess WR. Attempted transovarial and venereal transmission of African swine fever virus by the Iberian soft Tique <i>Ornithodoros (Pavlovskyella) maroccanus</i> (Acari: Ixodoidea: Argasidae). J Med Entomol. 1994 May;31(3):373-81.
17	Endris RG, Haslett TM, Hess WR. African swine fever virus infection in the soft Tique, <i>Ornithodoros (Alectorobius) puertoricensis</i> (Acari: Argasidae). J Med Entomol. 1992 Nov;29(6):990-4.
18	Endris RG, Hess WR. Experimental transmission of African swine fever virus by the soft Tique <i>Ornithodoros (Pavlovskyella) maroccanus</i> (Acari: Ixodoidea: Argasidae). J Med Entomol. 1992 Jul;29(4):652-6.
19	Endris RG, Hess WR, Caiado JM. African swine fever virus infection in the Iberian soft Tique, <i>Ornithodoros (Pavlovskyella) maroccanus</i> (Acari: Argasidae). J Med Entomol. 1992 Sep;29(5):874-8.
20	Endris RG, Haslett TM, Hess WR. Experimental transmission of African swine fever virus by the Tique <i>Ornithodoros (Alectorobius) puertoricensis</i> (Acari: Argasidae). J Med Entomol. 1991 Nov;28(6):854-8.
21	Haresnape JM, Wilkinson PJ. A study of African swine fever virus infected Tiques (<i>Ornithodoros moubata</i>) collected from three villages in the ASF enzootic area of Malawi following an outbreak of the disease in domestic Porcs. Epidemiol Infect. 1989 Jun;102(3):507-22.
22	Hess WR, Endris RG, Lousa A, Caiado JM. Clearance of African swine fever virus from infected Tique (Acari) colonies. J Med Entomol. 1989 Jul;26(4):314-7.
23	Endris RG, Haslett TM, Geering G, Hess WR, Monahan MJ. A hemolymph test for the detection of African swine fever virus in <i>Ornithodoros coriaceus</i> (Acari: Argasidae). J Med Entomol. 1987 Mar;24(2):192-7.
24	Hess WR, Endris RG, Haslett TM, Monahan MJ, McCoy JP. Potential arthropod vectors of African swine fever virus in North America and the Caribbean basin. Vet Parasitol. 1987 Dec;26(1-2):145-55.
25	Mellor PS, Wilkinson PJ. Experimental transmission of African swine fever virus by <i>Ornithodoros savignyi</i> (Audouin). Res Vet Sci. 1985 Nov;39(3):353-6.
26	Thomson GR. The epidemiology of African swine fever: the role of free-living hosts in Africa. Onderstepoort J Vet Res. 1985 Sep;52(3):201-9. Review.
27	Grocock CM, Hess WR, Gladney WJ. Experimental transmission of African swine fever virus by <i>Ornithodoros coriaceus</i> , an argasid Tique indigenous to the État-Uniss. Am J Vet Res. 1980 Apr;41(4):560-4.
28	Plowright W, Perry CT, Greig A. Sexual transmission of African swine fever virus in the Tique, <i>Ornithodoros moubata porcinus</i> , Walton. Res Vet Sci. 1974 Jul;17(1):106-13.
29	Greig A. The localization of African swine fever virus in the Tique <i>Ornithodoros moubata porcinus</i> . Arch Gesamte Virusforsch. 1972;39(1):240-7.
30	Plowright W, Perry CT, Peirce MA. Transovarial infection with African swine fever virus in the argasid Tique, <i>Ornithodoros moubata porcinus</i> , Walton. Res Vet Sci. 1970 Nov;11(6):582-4.
31	Plowright W, Perry CT, Peirce MA, Parker J. Experimental infection of the argasid Tique, <i>Ornithodoros moubata porcinus</i> , with African swine fever virus. Arch Gesamte Virusforsch. 1970;31(1):33-50.
32	Plowright W, Parker J, Pierce MA. The epizootiology of African swine fever in Africa. Vet Rec. 1969 Dec 13;85(24):668-74

Tableau 2 : Liste des 32 articles de référence sélectionnés pour leurs données originales sur la compétence vectorielle des tiques *Ornithodores* pour le virus de la PPA.

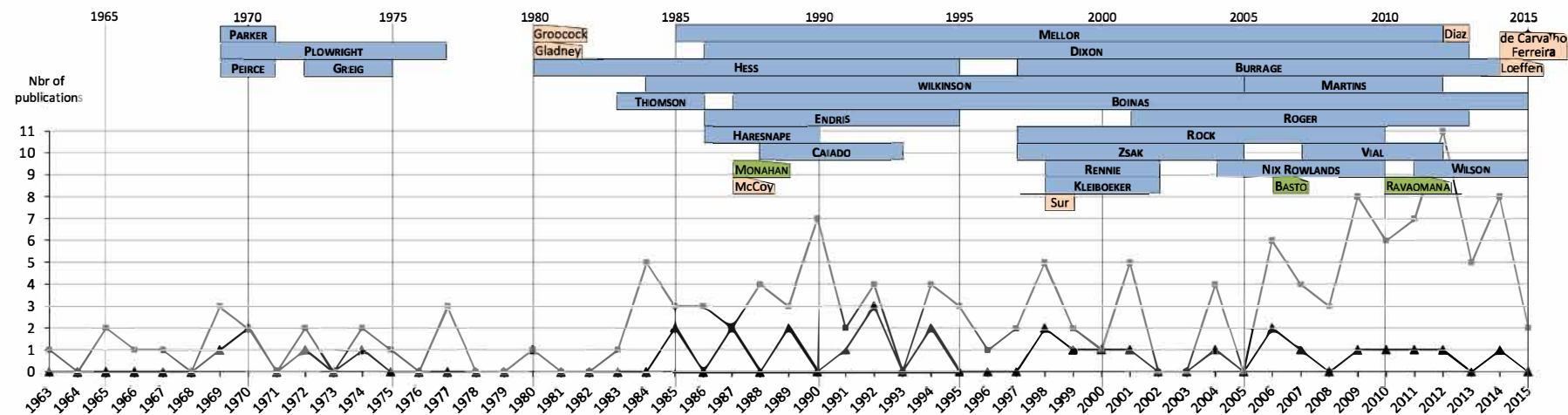


Figure 13: Répartition dans le temps des 32 articles de référence (ligne noire) et des 140 publications récoltées d'après les mots clés « Tique » et « ASFV » (ligne grise).
 Le nombre de publications est rapporté sur l'axe Y et l'année de publication sur l'axe X. Sur le haut du graphique, les premiers et derniers auteurs des 32 articles de référence sont indiqués dans des boîtes. La longueur des boîtes représente la période de temps de publication pour chaque auteur dans la liste des 140 articles récoltés. La couleur des boîtes indique le nombre de publications pour chaque auteur (orange : une seule publication, vert : deux publications, bleu : trois publications et plus).

Références	Espèce de tiques	Statut de la colonie (1)	Origine de la colonie	Souche du virus de la PPA	Hôte d'origine	Origine géographique et géotype de la souche virale
N°1 De Carvalho Ferreira, 2014	<i>O. moubata</i>	Lab	Inconnue	Ourt/88/1	Tique	Portugal I
				Liv/13/33	Tique	Zambie I
				Georgia/2007/1	Porc	Géorgie II
				Malta/78	Porc	Malte I
				Netherlands/86	Porc	Pays-Bas I
				Brazil/78	Porc	Brésil I
N°2 Diaz, 2012	<i>O. erraticus</i>	Terrain	Portugal	Georgia/2007/1	Porc	Géorgie II
				Ourt/88/1	Tique	Portugal I
N°3 Boinas, 2011	<i>O. erraticus</i>	Terrain	Portugal	Ourt/88/1	Tique	Portugal I
				Ourt	Tique	Portugal I
				Mart	Tique	Portugal I
N°4 Ravaomanana, 2010	<i>O. porcinus</i>	Terrain	Madagascar	Madagascar/08	Tique	Madagascar II?
N°5 Rowlands, 2009	<i>O. erraticus</i>	Terrain	Portugal	NH/P68	Porc	Portugal I
				Rec34	Rec	Production de laboratoire
				Rec4	Rec	Production de laboratoire
N°6 Vial, 2007	<i>O. sonrai</i>	Terrain	Sénégal	Senegal/06	Tique	Sénégal I?
N°7 Basto, 2006	<i>O. erraticus</i>	Terrain Lab < 10	Portugal	ASFV/P99	Tique	Portugal I
N°8 Rowlands, 2006	<i>O. erraticus</i>	Terrain	Portugal	NH/P68	Porc	Portugal I
				Rec34	Rec	Production de laboratoire
				Rec4	Rec	Production de laboratoire
				ASFV/P99	Tique	Portugal I
				Lisbon/60	Porc	Portugal I
				Nu/95/4	Porc	Sardaigne I
N°9 Burrage, 2004	<i>O. porcinus</i>	Inconnue	Inconnue	Pretoriuskop/96/4/1	Tique	Afrique du Sud XX
				Pr4Δ3-C1	Rec	Production de laboratoire
				Pr4Δ3-C2	Rec	Production de laboratoire
				Pr4Δ5-1	Rec	Production de laboratoire
				Pr4Δ5-2	Rec	Production de laboratoire
N°10 Rennie, 2001	<i>O. moubata</i>	Lab > 10	Inconnue	Liv/13/33	Tique	Zambie I
				Vic/T90/1	Tique	Zimbabwe I
N°11 Rennie, 2000	<i>O. moubata</i>	Lab > 10	Inconnue	Liv/13/33	Tique	Zambie I
				Vic/T90/1	Tique	Zimbabwe I
N°12 Kleiboeker, 1999	<i>O. porcinus</i>	Lab < 5	Afrique du Sud	Chiredzi/83/1	Tique	Zimbabwe I
				Pretoriuskop/96/4/1	Tique	Afrique du Sud XX
			Kenya	MwLil/20/1	Tique	Malawi VIII
			Malawi	MwLil/20/1	Tique	Malawi VIII
N°13 Kleiboeker, 1998	<i>O. porcinus</i>	Lab < 5	Zimbabwe	Chiredzi/83/1	Tique	Zimbabwe I
				Crocodil/96/1	Tique	Afrique du Sud XIX
				Pretoriuskop/96/4/1	Tique	Afrique du Sud XX
		Terrain		Nooitverwacht/96/6	Tique	Afrique du Sud XIX
N°14 Rennie, 1998	<i>O. moubata</i>	Lab < 10	Inconnue	Liv/13/33	Tique	Zambie I
				Vic/T90/1	Tique	Zimbabwe I
N°15 Boinas, 1994	<i>O. erraticus</i>	Terrain	Portugal	Ourt/88/1	Tique	Portugal I
				Ourt/88/2	Tique	Portugal I
				Tomar/87	Porc	Portugal I
				Ourt	Tique	Portugal I
				Mart	Tique	Portugal I
N°16 Endris, 1994	<i>O. erraticus*</i>	Lab < 10	Portugal	Portugal/86	Porc	Portugal I
N°17 Endris, 1992	<i>O. puertoricensis</i>	Lab < 10	Haïti	DRII	Porc	République Dominicaine I
N°18 Endris, 1992	<i>O. erraticus*</i>	Lab < 10	Portugal	Portugal/86	Porc	Portugal I
N°19 Endris, 1992	<i>O. erraticus*</i>	Lab < 10	Portugal	Portugal/86	Porc	Portugal I
N°20 Endris, 1991	<i>O. puertoricensis</i>	Lab < 10	Haïti	DRII	Porc	République Dominicaine I
N°21 Haresnape, 1989	<i>O. porcinus*</i>	Terrain	Malawi	MwLil/20/1	Tique	Malawi VIII
N°22 Hess, 1989	<i>O. moubata SL*</i>	Terrain	Zimbabwe	Zimbabwe/83/a	Tique	Zimbabwe I?

		Lab < 10	Zimbabwe			
	<i>O. erraticus</i>	Lab < 10	Portugal			
N°23 Endris, 1987	<i>O. coriaceus</i>	Lab < 5	Inconnue	DRII	Porc	République Dominicaine I
				Zimbabwe/83/b	Tique	Zimbabwe I?
N°24 Hess, 1987	<i>O. coriaceus</i>	Lab < 5	État-Unis	DRII	Porc	République Dominicaine I
				Tengani/62	Porc	Malawi V/VI
				Zimbabwe/82	Tique	Zimbabwe I?
	<i>O. parkeri</i>	Lab > 10	Inconnue	Zimbabwe/82	Tique	Zimbabwe I?
	<i>O. puertoricensis</i>	Lab < 5	Haïti	DRII	Porc	République Dominicaine I
	<i>O. turicata</i>	Lab > 10	États-Unis	Inconnue		
	<i>O. turicata</i>	Lab < 5	États-Unis			
N°25 Mellor, 1985	<i>O. savignyi</i>	Lab < 5	Soudan	Malta/78	Porc	Malta I
				Liv/13/33	Tique	Zambie I
N°26 Thomson, 1985	<i>O. moubata</i>	Lab	Afrique du Sud	Transvaal CV	Porc	Afrique du Sud Inconnue
				114a2	Tique ou phacochère	Afrique du Sud Inconnue
N°27 Groocock, 1980	<i>O. coriaceus</i>	Lab	Inconnue	Uganda/61	Phacochère	Ouganda X?
				Lisbon/60	Porc	Portugal I
N°28 Plowright, 1974	<i>O. porcinus</i>	Lab	Inconnue	Uganda/61	Phacochère	Ouganda X?
				KWH/12	Phacochère	Tanzanie X
N°29 Greig, 1972	<i>O. porcinus</i>	Lab	Ouganda	Uganda/61	Phacochère	Ouganda X?
				KWH/12	Phacochère	Tanzanie X
N°30 Plowright, 1970	<i>O. porcinus</i>	Terrain	Tanzanie	KWH/12	Phacochère	Tanzanie X
N°31 Plowright, 1970	<i>O. porcinus</i>	Lab	Ouganda	Uganda/61	Phacochère	Ouganda X?
				Tengani/62	Porc	Malawi V/VI
		Terrain		QEW	Phacochère	Ouganda X?
				QET	Tique	Ouganda X?
N°32 Plowright, 1969	<i>O. porcinus*</i>	Lab	Ouganda	Uganda/61	Phacochère	Ouganda X?
			Kenya	Tengani/62	Porc	Malawi V/VI
			Tanzanie			

Tableau 3 : Présentation des espèces de tiques et des souches de virus étudiées dans les 32 articles de référence. Concernant le statut de la colonie de tiques, "Lab"= tique élevée en laboratoire et âge de la colonie lorsqu'il est reporté par les auteurs. "*" est utilisé pour indiquer lorsque la nomenclature a été actualisée. "Rec"= souche recombinante ; "?" indique que le génotype du virus reste incertain.

* Souche de virus de la PPA :

Un total de 41 souches différentes de virus de la PPA a été identifié, dont une souche utilisée pour infecter *O. turicata* dans l'article n°24 qui reste complètement inconnue. 6/41 souches de virus de la PPA utilisées dans 3 articles différents étaient des souches recombinantes. Elles ont été obtenues à partir de 2 souches naturelles et ont été utilisées pour étudier les mécanismes génétiques spécifiques d'infection des tiques. Parmi les 34/41 souches naturelles restantes, 22 étaient officiellement répertoriées dans les bases de données référençant le virus de la PPA.

Les souches proviennent géographiquement de plus de 15 pays différents : 8 en Afrique et dans l'Océan Indien, 5 dans la région paléarctique y compris le Caucase, et 2 en Amérique du Sud et les îles des Caraïbes.

Concernant les hôtes d'origine des souches de virus de la PPA, 18/34 provenaient de tiques, 12/34 de porcs domestiques et 3/34 de phacochères, tandis que 1/34 avait une origine indéfinie (entre la tique et le phacochère).

Ces souches appartenaient à 7 géotypes différents. Le géotype I, largement distribué dans le monde, était majoritairement représenté avec 21/34 des souches. Deux autres souches, l'une malgache et l'autre européenne appartiennent au géotype II. Les 9/34 souches restantes appartiennent aux géotypes V/VI, VIII, X, XIX, XX, ce qui reflète la grande diversité des souches de virus de la PPA issues de l'Afrique orientale et australe. Enfin, le géotype de la souche Transvaal CV et 114a2 provenant d'Afrique du Sud est resté inconnu. Pour certaines souches, leurs géotypages n'ont pas été réalisés, mais des suppositions ont été faites d'après leurs origines géographiques et leurs dates de prélèvement. Selon l'étude de Lubisi (Lubisi *et al.*, 2005), il est probable que la souche malgache de l'article n°4 appartienne au géotype II et la souche sénégalaise de l'article n°6 au géotype I. Les souches zimbabwéennes sont censées appartenir au géotype I mais cette attribution reste incertaine parce que tous les pays voisins présentent de nombreux géotypes différents. Les souches ougandaises pourraient appartenir au géotype X parce qu'il est le seul géotype détecté dans ce pays avant 1995.

* Couple tique-virus étudié

Il existe une très grande diversité des couples tique-virus étudié dans les 32 articles de référence puisqu'un total de 45 couples peut être référencé (Tableau 3). La plupart de ces couples tique-virus (29/45) ont été étudiés seulement une fois. Huit autres couples ont été étudiés à deux reprises, 6 couples ont été étudiés 3 fois et les 2 derniers couples (*O. moubata*-Liv / 13/33 et *O. porcinus*-Uganda / 61) ont été étudiés 4 fois.

2. Méthodologie d'infection des tiques et de suivi (Tableau 4 et 5)

Plusieurs modes d'infection des tiques avec le virus de la PPA, ainsi que plusieurs systèmes, ont été utilisés (Tableau 4). Le repas de sang sur hôte vertébré a été souvent rapporté, soit dans les études de terrain, soit dans certaines expériences de laboratoire menées sur porcs infectés et sur phacochères. Ainsi, 20/32 articles ont utilisé des porcs domestiques, 1/32 des phacochères et 4/32 n'ont pas indiqué l'espèce des suidés.

Les techniques de gorgement artificiel ont été beaucoup plus utilisées après 1995 (10/32 comparativement à 3/32 avant 1995). Plusieurs types de systèmes sont mentionnés : diverses adaptations du système proposé par Osborne et Mellor (Osborne & Mellor, 1985), en utilisant de la peau de poulet ou une membrane de Parafilm® ; le système de Fourie (Fourie *et al.*, 2013) adapté de Krober et Guerin (Krober & Guerin, 2007a) ; le système de Mango et Galun (Mango & Galun, 1977) ; le système de Davis (Davis *et al.*, 1983) ; et le système Hemotek®, spécifiquement dédié au gorgement d'arthropodes et utilisé avec une membrane de Parafilm®. Seul 1/32 article ne donnait pas d'informations particulières. Une autre méthode d'alimentation artificielle citée par les auteurs est l'utilisation de tubes capillaires remplis de sang qui sont insérés sur les pièces buccales des tiques. Cette méthode a été utilisée dans 4/32 articles, publiés par les mêmes scientifiques entre 1969 et 1974. Enfin, la dernière voie d'infection est une inoculation à la seringue de culture virale directement dans le corps des tiques. Elle a été utilisée dans 5/32 articles à partir de 1994, en particulier pour étudier les obstacles naturels à l'entrée du virus dans les tiques.

Lors des gorgements artificiels, le sang a été préparé de différentes façons : soit le sang a été défibriné (6/17), soit il a été récolté dans des tubes héparinés (9/17), et seulement dans 2/17 articles le type de sang utilisé n'a pas été précisé. Des antibiotiques ont été ajoutés au repas sanguin dans une seule étude (n°2).

Le titre du virus de la PPA dans le sang était très hétérogène d'une étude à l'autre et certains auteurs ont même testé plusieurs titres dans un seul article. Seul 1 article (n°31) a utilisé une dose inférieure à 10^2 HAD₅₀/mL de sang lors d'expériences sur la dose infectieuse minimale nécessaire pour infecter une tique. Une faible dose, à moins de 10^4 HAD₅₀/ml de sang, a été utilisée dans 6/32 articles. Presque la moitié des études (18/32) ont testé une dose moyenne comprise entre 10^4 et 10^6 HAD₅₀/ml de sang, et la même proportion (17/32) a testé une dose élevée, strictement supérieure à 10^6 HAD₅₀/ml de sang. Pour les études de terrain, des titres n'ont pas été signalés, mais ils sont très probablement élevés en reflet des virémies classiquement observées chez les porcs malades.

Après leur infection, les tiques étaient habituellement suivies par groupes dans 12/32 articles, mais une surveillance individuelle a également été menée pour des expériences spécifiques, tels que des tests de transmission sexuelle (TS) du virus de la PPA ou de transmission transovarienne (TOT) ou lors de l'étude de la propagation du virus dans les tiques. Des repas de sang supplémentaires ont été effectués dans 23/32 articles, toujours avec du sang sain sans présence de virus. L'objectif principal de ce repas était d'évaluer les différentes voies de transmission : transmission horizontale au suidé (TH), TOT, TS ou l'excrétion de virus dans le liquide coxal. Aucun auteur n'a jamais essayé l'étude de plusieurs repas de sang infectieux.

En ce qui concerne la description des méthodes utilisées pour la détection du virus de la PPA et sa quantification dans les tiques (Tableau 5), il a été décidé de supprimer les articles n°11, 17 et 19 qui ne traitent que les traits d'histoire de vie des tiques en comparant des tiques mises en présence du virus versus des tiques n'ayant jamais rencontré le virus, sans aucune détection virale.

La méthode la plus utilisée par les articles (25/29) est l'isolement viral et le titrage basé sur les techniques d'hémadsorption (HAD). L'isolement viral consiste à détecter le virus de la PPA en fonction de son aptitude à agréger les globules rouges à une cellule macrophagique infectée, formant ce qui est communément appelé « une rosette » (exemple en Figure 24). Le titrage consiste en la répétition de plusieurs isolements en parallèle, à plusieurs dilutions, afin d'estimer le titre de virus en utilisant le calcul de Kärber (Kärber, 1931) (décrit plus en détail dans le matériel et méthodes du chapitre 2). Les résultats sont exprimés en HAD₅₀ lors de l'utilisation de souches hémadsorbantes ou TCID₅₀ (dose infectieuse en culture tissulaire) lors de la recherche de l'effet cytopathogène avec des souches non-hémadsorbantes.

Plusieurs autres procédés ont été signalés pour détecter la présence de virus ou leur localisation dans les tiques : détection de l'ADN viral par PCR (6/29), observation de particules de virus par immunofluorescence directe (6/29), détection par immunoblot (1/29), et localisation du virus dans les tiques par histologie dans 7/29 cas. Pour confirmer que le virus est effectivement vivant dans les tiques, 3/29 autres articles ont utilisé une technique de PCR par rétro-transcription, consistant à détecter la production d'ARNm provenant de la réplication du virus. La technique de PCR en temps réel a été utilisée seulement par l'article n°1 pour quantifier le virus dans les tiques et réaliser une surveillance de son accumulation. Les résultats de Ct qui y sont donnés ont été transformés en équivalent HAD₅₀ par les auteurs pour estimer un titre de virus.

Enfin, la dernière méthode de suivi de l'infection, mais aussi d'évaluation de la transmission, par gorgement de tiques infectées sur un porc, a été la plus utilisée (15/29).

Pour toutes ces méthodes de détection et de quantification virale, la majorité des auteurs (20/29) ont testé les tiques individuellement, mais 2/29 articles ont préféré une approche groupée surtout pour les petits stades immatures afin d'augmenter la sensibilité de la méthode de détection, et 7/29 articles ont même mélangé les deux approches.

Références	Espèce de tiques	Infection (repas de sang ou inoculation)	Titre du virus dans le sang (log ₁₀ HAD ₅₀ /ml)	Repas additionnel	Maintien des tiques durant l'expérience	Stade des tiques	Durée de l'expérience (jpi)
N°1 De Carvalho Ferreira, 2014	<i>O. moubata</i>	Mbr	≥ 4 à < 6	-	G	Ny3, Ny4	≤60
N°2 Diaz, 2012	<i>O. erraticus</i>	Mbr	≥ 4 à < 6	-	G	Ny, Ad	>61 à ≤181
N°3 Boinas, 2011	<i>O. erraticus</i>	Porc	Terrain	Porc	G	Lv – Ad	>182
N°4 Ravaomana, 2010	<i>O. porcinus</i>	Porc	Terrain	-	-	Ny – Ad	>182
N°5 Rowlands, 2009	<i>O. erraticus</i>	Mbr	≥ 6	-	G	Ny5, Ad	>182
		Seringue	≥ 2 à < 4	-			
N°6 Vial, 2007	<i>O. sonrai</i>	Suidae	Terrain	-	-	Inconnue	>182
N°7 Basto, 2006	<i>O. erraticus</i>	Porc	Terrain	-	G	Ny1 – Ad	>182
		Mbr	≥ 4 à < 6	-			
N°8 Rowlands, 2006	<i>O. erraticus</i>	Mbr	≥ 4 à < 6	Mbr	I/G	Ny5, Ad	>182 ; Nu95/4 >61 à ≤181
		Seringue	≥ 2 à < 4	-			
N°9 Burrage, 2004	<i>O. porcinus</i>	Mbr	≥ 6	Mbr	I/G	Ny1 – Ad	>182
N°10 Rennie, 2001	<i>O. moubata</i>	Mbr	≥ 4 à < 6	Mbr	I/G	Ny, Ad	>61 à ≤181
N°11 Rennie, 2000	<i>O. moubata</i>	Mbr	≥ 4 à < 6	Mbr	I/G	Ny1 – Ad	>61 à ≤181
N°12 Kleiboeker, 1999	<i>O. porcinus</i>	Mbr	≥ 6	Mbr	I	Ny4 – Ad	>182 ; Chiredzi/83/1 ≤60
		Seringue	≥ 4 à < 6	-	G		
		Porc	≥ 6	-			
N°13 Kleiboeker, 1998	<i>O. porcinus</i>	Porc	≥ 6	Porc	G	Ny2, Ny3	>61 à ≤181; Chiredzi/83/1 >182
				Mbr	I		
N°14 Rennie, 1998	<i>O. moubata</i>	Mbr	≥ 4 à < 6	Mbr	I/G	Ny2 – Ad	>61 à ≤181
		Seringue	≥ 4 à < 6	-	G		
				Porc			
N°15 Boinas, 1994	<i>O. erraticus</i>	Seringue	≥ 2 à < 4 ≥ 4 à < 6	-	I/G	Ny1 – Ad	>61 à ≤181
		Mbr	2.3 à 6.8	-			
		Porc	≥ 6	Porc			
N°16 Endris, 1994	<i>O. erraticus</i> *	Porc	≥ 4 à < 6	Porc	G	Ad	>182
N°17 Endris, 1992	<i>O. puertoricensis</i>	Porc	≥ 4 à < 6	Porc	G	Ny2 – Ad	>182
N°18 Endris, 1992	<i>O. erraticus</i> *	Porc	≥ 6	Porc	G	Lv – Ad	>182
N°19 Endris, 1992	<i>O. erraticus</i> *	Porc	≥ 6	Porc	G	Lv – Ad	>182
N°20 Endris, 1991	<i>O. puertoricensis</i>	Porc	≥ 4 à < 6	Porc	I/G	Ny2 – Ad	>182
N°21 Haresnape, 1989	<i>O. porcinus</i> *	Suidae	Terrain	-	G	Ny – Ad	>182
N°22 Hess, 1989	<i>O. moubata</i> SL*	Suidae	Terrain	-	I/G	Ny – Ad	4 cycle gonotrophique
		Porc	≥ 6	Porc			
		<i>O. erraticus</i>	Porc	≥ 6	Porc	I	
N°23 Endris, 1987	<i>O. coriaceus</i>	Porc	≥ 6	-	G	Ny2	DR11 ≤60 ; Zimbabwe/83/b >61 à ≤181
N°24 Hess, 1987	<i>O. coriaceus</i>	Porc	≥ 6	Porc	G	Ny – Ad	>182
	<i>O. parkeri</i>	Porc	≥ 6	Porc	G	Ny late	>61 à ≤181
	<i>O. puertoricensis</i>	Porc	≥ 6	Porc	G	Ny2 – Ad	>182

	<i>O. turicata</i>	Porc	≥ 6	Porc	G	Inconnue	≤60
N°25 Mellor, 1985	<i>O. savignyi</i>	Mbr	≥ 4 à < 6	Mbr	G	Ny1 – Ad	>61 à ≤181
		Porc	≥ 6	Porc			
N°26 Thomson, 1985	<i>O. moubata</i>	Mbr	≥ 2 à < 4 & ≥ 4 à < 6		G	Ny2 – Ad	≤60
		Porc	4.1 à 7.2				
		Phacochère	≥ 2 à < 4				
N°27 Grocock, 1980	<i>O. coriaceus</i>	Porc	3 à 7.5	Porc	G	Ny1 – Ad	Uganda/61 >61 à ≤ 181 ; Lisbon/60 ≤60
N°28 Plowright, 1974	<i>O. porcinus</i>	Capillaire	5.2 à 6.9	Porc	G	Ad	Uganda/61 >61 à ≤ 181; KWH/12 >182
N°29 Greig, 1972	<i>O. porcinus</i>	Porc	≥ 4 à < 6		G	Ad	KWH/12 >182 ; Uganda/61 >61 à ≤181
		Capillaire	5.1 à 6.3				
N°30 Plowright, 1970	<i>O. porcinus</i>	Suidae	Terrain	Porc	I/G	Ny1 – Ad	>61 à ≤ 181
N°31 Plowright, 1970	<i>O. porcinus</i>	Porc	≥ 6	Porc	G	Ny1 – Ad	QEW ≤60; QET - Tengani/62 >61 à ≤181; Uganda/61 >182
		Capillaire	0.3 à 5.5				
N°32 Plowright, 1969	<i>O. porcinus</i> *	Capillaire	≥ 6	Porc	I/G	Ny2 – Ad	>61 à ≤181

Tableau 4 : Méthodologies utilisées dans les 32 articles de références pour l'infection et le suivi des tiques *Ornithodoros* par le virus de la PPA.

Concernant l'infection et les repas additionnels, "Mbr" = repas sur membrane artificielle ou non (exemple peau de poulet, silicone ou parafilm®), et "Suidae" est utilisé quand l'animal infectant n'a pas pu être déterminé. Pour le maintien des tiques durant l'expérience, "G" = maintien en groupe et "I" = maintien individuel. Pour le stade des tiques "Ny" = nymphes avec l'avancée du stade et « Ad » = Adulte.

Références	Immunofluorescence directe	Titrage du virus par HAD	Histologie	PCR	RT-PCR*	Signe clinique de porcs mordus par des tiques
N°1 De Carvalho Ferreira, 2014				+ (2)		
N°2 Diaz, 2012		+				
N°3 Boinas, 2011	+	+		+		+
N°4 Ravaomana, 2010				+ (3)		
N°5 Rowlands, 2009	+	+				
N°6 Vial, 2007				+ (3)		
N°7 Basto, 2006	+	+		+ (4)		
N°8 Rowlands, 2006	+	+			+	
N°9 Burrage, 2004		+	+		+	
N°10 Rennie, 2001		+	+			
N°12 Kleiboeker, 1999		+	+		+	
N°13 Kleiboeker, 1998		+	+			+
N°14 Rennie, 1998		+	+			
N°15 Boinas, 1994	+	+		+		+
N°16 Endris, 1994		+				+
N°18 Endris, 1992		+				+
N°20 Endris, 1991		+				+
N°21 Haresnape, 1989		+				
N°22 Hess, 1989						+
N°23 Endris, 1987	+ (1)	+	+			
N°24 Hess, 1987		+	+			+
N°25 Mellor, 1985		+				+
N°26 Thomson, 1985		+				+
N°27 Groocock, 1980		+				+
N°28 Plowright, 1974		+				+
N°29 Greig, 1972	+	+				
N°30 Plowright, 1970		+				+
N°31 Plowright, 1970		+				+
N°32 Plowright, 1969		+				+

Tableau 5 : Techniques utilisées par 29 des 32 articles de référence pour la détection du virus de la PPA et/ou sa quantification dans les tiques.

(1) immuno-dot blot utilisé par une méthode d'immunofluorescence directe. Plusieurs techniques de PCR sont utilisées sous la dénomination commune "PCR" : (2) pour les PCR en temps-réel, (3) pour les PCR nichées, (4) pour l'utilisation de PCR conventionnelles suivies de PCR nichées. "*" : rétro transcription PCR.

3. Mesures de compétence vectorielle utilisées par les auteurs

* Mesure de la persistance du virus de la PPA dans les tiques

Tous les articles de référence ont enregistré la durée de persistance du virus dans les tiques. Toutefois, le contrôle a été effectué sur des durées variables selon les études. 9/45 couples ont été étudiées sur moins de 60 jpi, 17/45 couples entre 61 jpi et 181 jpi, et seulement la moitié des couples tique-virus (19/45) a été suivie plus de 182 jpi (Tableau 4). Parmi ces 19 couples, 5 ont été suivies sur des périodes très longues jusqu'à 5 ans : *O. erraticus*-Portugal/86, *O. erraticus*-Mart, *O. erraticus*-Ourt/88/1, *O. erraticus*-Ourt, *O. moubata*-Zimbabwe/83/a. Le titre du virus dans les tiques a été signalé au moins une fois pour

la majorité des couples (39/45). Toutefois, 27/39 réalise aussi un suivi dans les tiques, plus régulier au cours du temps. Le suivi de l'accumulation virale implique à la fois l'échantillonnage d'une partie des tiques pour chaque période mesurée (avec l'hypothèse que toute la population de tiques est homogène), et l'augmentation du titre au cours du temps suite à l'estimation de la quantité initiale de virus ingérée par les tiques. Pour plusieurs couples échantillonnés sur le terrain, le jour de l'infection des tiques a été estimé en interrogeant les fermiers sur le dernier foyer de PPA qu'ils avaient subi, seule une étude (n°7) a échantillonné les tiques durant l'épidémie et réalisé un suivi. Dans les expériences de laboratoire, la mesure du titre de virus juste après le gorgement infectieux a été faite sur 26/39 couples, et moins d'une semaine après l'infection pour 5/39 autres couples. Ces résultats comprennent 11 couples pour lesquelles les auteurs ont estimé la quantité initiale du virus ingérée, de façon indirecte par pesée des tiques avant et après le repas de sang infectieux. Dans l'article n°3, les auteurs ont évalué directement le volume de sang ingéré en mesurant l'absorption par les capillaires utilisés pour le gorgement.

Pour chaque modalité d'étude (temps, concentration...), des répétitions ont été réalisées pour les 45 couples tique-virus et le taux d'infection des tiques était disponible pour 37/45 couples, ce qui pourrait refléter la prévalence de l'infection dans une population de tiques si l'on considère les échantillonnages comme représentatifs. Le nombre de répétitions est cependant très variable d'un couple à l'autre. Trois études de terrain (n°3, 7 et 21) ont testé plus de 3000 tiques en mettant en commun les stades de nymphe précoce tandis que quatre autres (articles n°4, 6, 22, 30) ont testé de 34 à 515 tiques individuellement. Dans des expériences de laboratoire, le nombre de répétitions est souvent beaucoup plus petit, avec 10 à 20 tiques testées à chaque mesure pour 34/45 couples et moins de 10 tiques dans 5/45 autres couples.

* Mesure de la transmission horizontale du virus de la PPA par les tiques lors de repas de sang

La transmission horizontale du virus de la PPA aux porcs pendant un repas de sang des tiques a été testée seulement pour 26/45 couples tique-virus, notamment par l'observation des symptômes cliniques chez les porcs (ou le phacochère pour l'article n°26) et pour 1/45 par la détection du virus dans le sang suite à un gorgement artificiel sur membrane pour l'article n°25. La TH a été testée une seule fois pour 7/27 couples alors qu'elle a été testée à différents moments post-infection pour tous les autres couples (20/27), afin d'évaluer la durée de la transmission possible des tiques infectées. Pour cette évaluation, les auteurs ont utilisé les mêmes tiques dans près de la moitié des couples (9/20) tandis qu'ils ont utilisé différentes

tiques dans 6/20 autres couples, cela reste impossible à déterminer pour les 5/20 articles restants. La plupart des auteurs ont indiqué le succès de la TH, et des données partielles sont disponibles pour les taux d'infection des tiques s'étant gorgées ou sur le titres de virus moyens dans ces tiques. Enfin, la présence de virus dans les sécrétions et les organes impliqués dans la transmission (la salive et le fluide coxal, glandes salivaires et glandes coxales) a été testée dans 9 et 13 couples tique-virus respectivement, dans le but d'étudier les différentes voies de transmission. Cette détection permet aussi de suggérer que la TH est possible pour 6/45 autres couples tique-virus qui n'ont pas été directement testés.

* Mesure de la transmission transtadiale du virus de la PPA dans les tiques

La transmission transtadiale (TST) n'est pas exactement un mode de transmission, puisqu'elle est définie comme l'aptitude d'un parasite à être transmis au sein de son vecteur successivement d'un stade de développement à un autre (Burgdorfer & Varma, 1967). Cependant, c'est souvent la voie de transmission décrite et testée en premier dans la littérature de référence. Chez les tiques, cela consiste en la persistance de l'infection au cours des différents événements de métamorphose et de mues. Ces transformations n'ont pas d'impact sur l'hémolymphe des tiques ainsi que sur la plupart des organes internes, puisqu'il implique principalement un changement de cuticule et une modification du métabolisme, sauf peut-être pendant la seule véritable métamorphose entre le stade de larve à celui de première nymphe.

Chez les tiques *Ornithodoros* vectrices du virus de la PPA, cette persistance est connue depuis longtemps, mais n'a été évaluée que dans 16/45 couples tique-virus. Elle a même été testée sur plusieurs stades successifs dans la moitié de ces 16 couples.

* Mesure de la transmission sexuelle du virus de la PPA par les tiques

La TS est un processus épidémiologique très important pour les parasites car elle peut se produire sans réinfection via un hôte vertébré et permet la persistance des arbovirus au sein de la population d'arthropodes vecteurs (Mellor & Wilkinson, 1985). La TS est définie comme la transmission du parasite du mâle à la femelle au cours de la copulation (Weaver, 2004). Le contraire, la transmission de la femelle au mâle est théoriquement possible, mais plus difficilement réalisable chez les tiques molles. En effet, au cours de la copulation, le mâle dilate l'orifice génital de la femelle avec ses parties buccales pour déposer son spermatophore dans l'utérus (Feldman-Muhsam, 1967b, Feldman-Muhsam, 1967a). La transmission du virus de la PPA peut alors s'effectuer via la salive du mâle (Plowright *et al.*, 1974) ou par contact sexuel,

avec le fluide séminal excrété par les glandes accessoires mâles ou par le spermatophore où le virus a déjà été observé (article n°13, 28 et 29).

Si l'on synthétise les mesures de la transmission sexuelle du virus de la PPA par les tiques réalisées dans les articles de référence, il s'avère qu'elle n'a été mesurée que pour 4/45 couples. Des copulations multiples ont été testées pour 3 des couples, avec les mâles infectés et les femelles saines ou inversement. En outre, la détection du virus a été menée dans les organes sexuels pour 2/3 de ces couples et dans 6 autres couples de plus. La détection du virus dans les organes reproducteurs peut aussi être considérée comme une mesure indirecte de TS. La TS a été essentiellement rapportée des mâles vers les femelles, l'inverse n'a jamais été confirmé.

* Mesure de la transmission transovarienne du virus de la PPA par les tiques

La TOT peut être définie comme la transmission du virus à la descendance à travers les tissus ovariens infectés. Ce mode de transmission permet également au virus d'assurer sa persistance dans les populations d'arthropodes vecteurs sans qu'il y ait la présence d'hôtes vertébrés infectés à proximité (Thomson *et al.*, 1983).

La TOT des femelles à leur progéniture a été testée pour 12/45 couples tique-virus, et plusieurs cycles gonotrophiques successifs ont été testés pour 7/12 couples. La présence du virus dans des œufs a été indiquée pour 1/12 couple alors que l'infection des larves et des nymphes de ces pontes a été évaluée pour 9/12 couples. Pour les 2 dernières couples, les auteurs n'ont pas précisé ce qu'ils ont évalué exactement. La prévalence de l'infection dans la descendance a été évaluée pour 2/12 couples par le nombre d'œufs, de larves ou des nymphes infectés et pour 1/12 couple par le nombre de lots d'œufs infectés. Le nombre de mères capables de transmettre a été évalué pour les 2/12 mêmes couples que la prévalence chez les descendants. Les ovaires des femelles ont été testés dans 3/12 couples tique-virus, ainsi que dans 5/45 autres couples qui n'ont pas été directement testés pour la TOT. Ce résultat peut toutefois servir aussi de mesure indirecte de TOT.

Mesure des paramètres évaluant la compétence vectorielle	Nombre de couples tique – virus évalués	Implication de ces mesures dans les étapes de compétence
Durée de la persistance du virus dans les tiques	44	Maintien
Titre du virus dans les tiques	39	Infection
Taux d'infection des tiques	37	Maintien
Accumulation du virus dans les tiques (suivi de cinétique)	27	Infection
Transmission horizontale (HT) aux porcs (+ par gorgement artificiel)	25 (+1)	Maintien
Durée de la transmission du virus aux porcs	20	Transmission
Transmission transtadiale (TST)	16	Maintien
Pathogénie du virus dans les tiques	15	Transmission
Détection du virus dans la salive ou le fluide coxal	13	Maintien
Transmission transovarienne (TOT)	12	Transmission
Détection du virus dans les glandes salivaires et les glandes coxales	9	Maintien
Détection du virus dans les ovaires	8	Transmission
Transmission sexuelle (ST)	4	Maintien

Tableau 6 : Récapitulatif des mesures de compétence vectorielle utilisées dans les 32 articles de référence, classées par ordre décroissant du nombre de couples tique-virus étudiés pour chaque mesure.

C. Patrons généraux de la compétence vectorielle des tiques *Ornithodoros* pour le virus de la PPA.

Les mesures de compétence vectorielle sont nombreuses (Tableau 6), mais peuvent être regroupées en deux grandes catégories d'événements : l'entrée du virus de la PPA dans les tiques et de sa persistance dans les tiques, et la transmission du virus de la PPA par les tiques. Les résultats décrits dans la suite de cette synthèse sont donc présentés dans l'ordre des étapes de compétence.

D. Dynamique du virus dans les tiques

1. Entrée et dissémination du virus dans la tique

Une fois le virus ingéré par les tiques lors d'un gorgement sur un animal virémique, il est transporté avec le sang dans la lumière du tube digestif (Figure 14). Ainsi, la dynamique d'infection du virus coïncide en partie avec la dynamique de digestion de la tique dans les articles n°13, 5 et (Burrage, 2013). Le virus semble pouvoir s'accrocher à la paroi intestinale de la tique grâce à des récepteurs de reconnaissance spécifiques avant d'entrer dans les cellules intestinales et de se débarrasser de sa capside. Cette idée est soutenue par le fait que le virus de la PPA est capable de se répliquer seulement dans les tiques du genre *Ornithodoros*,

cependant l'identification de ces récepteurs n'a pas encore été établie (Nix, 2006, Rennie, 1998). Toutefois, il peut aussi subir une phagocytose passive puisque le virus effectue une réplication initiale dans les cellules digestives phagocytaires de l'épithélium intestinal qui sont les premières cellules à intervenir lors de la digestion (article n°12 et 13). Il infecte ensuite les autres cellules intestinales lors de l'hémolyse des globules rouges. Enfin, grâce à des microlésions de la paroi intestinale parfois formées lors des premières phases de digestion, le virus pourrait simplement traverser la paroi intestinale jusqu'à l'hémolymph. C'est le phénomène de « leaky-gut » décrit par (Sonenshine & Roe, 2013).

Une fois la barrière intestinale franchie, le virus peut se généraliser dans la tique, via l'hémolymph et l'infection des hémocytes. Les tissus connectifs, qui sont une jonction entre les organes, sont en premier infectés, puis ce sont les organes : glandes salivaires principalement dans les granules sécrétoires (acini de type II), glandes coxales, organes reproducteurs mâles et femelles, ganglion central et tubes de Malpighi (articles n°28 et 29). Ces deux derniers organes ne montrent cependant pas systématiquement d'infection comme dans l'article n°13. Malgré tout, après s'être généralisé dans toute la tique, les cellules intestinales restent le principal lieu de réplication du virus.

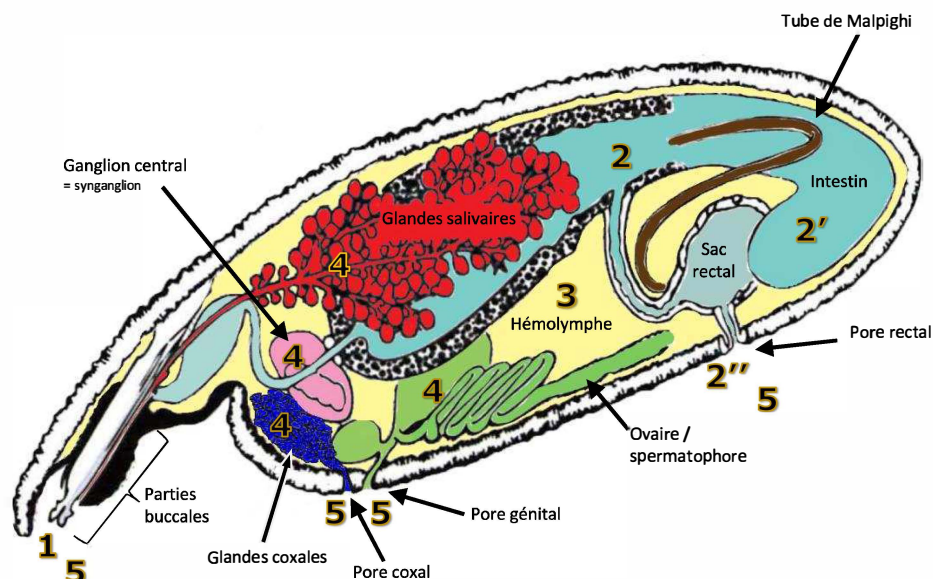


Figure 14 : Schéma anatomique d'une tique *Ornithodoros* représentant les principaux organes et étapes d'infection par le virus de la PPA.

1- ingestion du virus, 2- infection des cellules phagocytaires de l'épithélium intestinal, 2'- infection des autres cellules de l'épithélium intestinal, 2''- excrétion du virus dans les fèces lors de la digestion du repas de sang, 3- passage de la barrière intestinale et infection de l'hémolymph et des hémocytes, 4- infection des autres organes (glandes salivaires, glandes coxales, organes reproducteurs, ganglion central...), 5- excrétion du virus dans les fèces, sécrétion de la salive et de fluide coxal et TOT par les œufs après avoir franchi les barrières anatomiques des glandes salivaires, glandes coxales et la membrane des œufs. Modifié d'après (Sonenshine & Roe, 2013)

Le fait que certaines espèces de tique, ou même certains individus, ne s'infectent pas signifie que les tiques peuvent limiter la capacité du virus à se répliquer et se disséminer dans l'organisme. L'étape clé de l'infection semble être le franchissement de la barrière intestinale et particulièrement de la lame basale de l'intestin, constituée d'un assemblage de protéines et glycoprotéines. Plusieurs études ont montré que certaines souches virales n'arrivaient pas à infecter des tiques lors de repas sanguin, comme la souche Brazil/78 avec *O. moubata*, MwLil/20/1 avec *O. porcinus*, ou Zimbabwe/82 avec *O. parkeri* (articles n°1, 12 et 23). Cependant, si cette même souche est inoculée directement dans l'hémolymphe des tiques, le virus se réplique ensuite dans tous les tissus (articles n°5, 8, 12, 14, et 15).

Par la suite, les glandes salivaires et les glandes coxales constituent d'autres barrières physiques pour le virus car elles possèdent aussi une lame basale que le virus doit franchir. Certains essais de transmission sur porc ont montré que la transmission du virus par la salive n'était pas systématique (ex : *O. erraticus* et la souche Mart et Ourt/88/2 (article n°15) ou *O. coriaceus* et la souche Uganda/61 (article n°27)). Il en est de même avec la non-détection de certaines souches virales, par exemple la souche Uganda/61 qui n'était pas systématiquement détectée dans les sécrétions de fluide coxal sécrété par *O. moubata* (article n° 31), et ceci malgré la présence du virus dans l'hémolymphe.

La dernière barrière physiologique se trouve au niveau des organes reproducteurs et semblerait plus dépendante de l'espèce de tiques. Les études réalisées sur la TOT des espèces du complexe *O. moubata* se sont souvent terminées par un succès de transmission, contrairement à l'espèce *O. erraticus* chez qui la TOT n'a pas été démontrée. Toutefois, seules deux publications (n°16 et 22) testent ce mode de transmission chez *O. erraticus*.

Outre le franchissement de barrières tissulaires, le second facteur limitant l'infection semble être la dose de virus ingérée par la tique, en particulier lorsque l'entrée du virus dans la tique est réalisée par phagocytose passive. Certaines études de terrain sur l'espèce *O. moubata* ont suggéré qu'une concentration moyenne de virus dans le sang de l'hôte entre 10^3 et 10^5 HAD₅₀/ml était suffisante pour permettre une infection efficace et durable des tiques (article n°31 et Plowright, 1977). Ribeiro (Ribeiro *et al.*, 2015) indiquait un taux d'infection par la souche de virus Ourt/88/1 de 90,9 % après un gorgement sur porc virémique ayant un titre supérieur à 10^7 HAD₅₀/ml, de 56,9 % pour un titre proche de 10^6 HAD₅₀/ml et de 1,5 % pour un titre $< 10^5$ HAD₅₀/ml. L'infection par la souche Tomar/87 donnait des taux d'infection un peu différents de 73,1 %, 50 % et 5 % pour les mêmes titres viraux dans le repas sanguin.

2. Multiplication virale et cinétique du virus dans les tiques

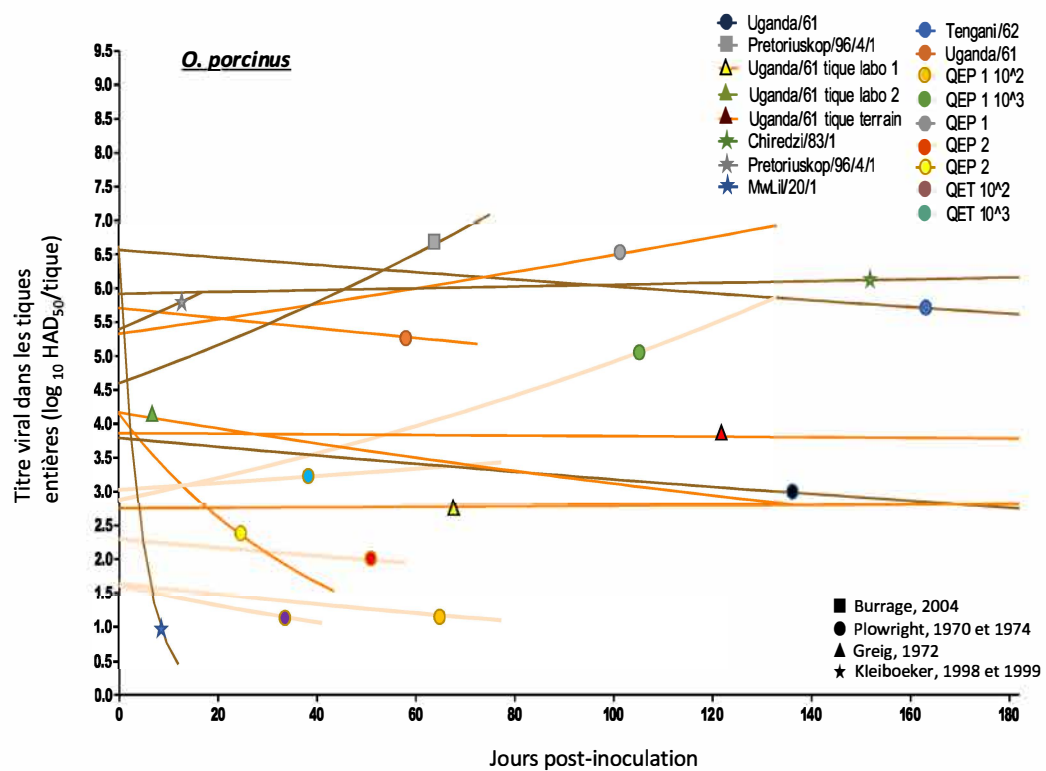
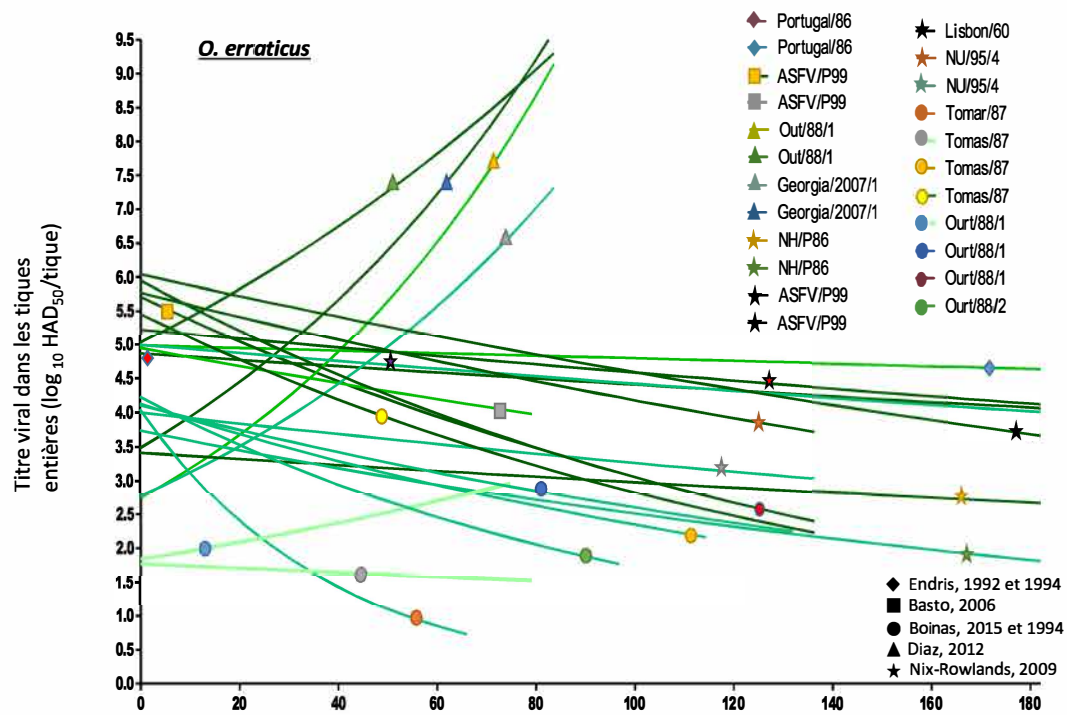
Une fois le virus rentré par ingestion dans la tique, deux cas de figure se produisent. Dans l'article n°1, lorsque le virus est incapable de franchir la barrière intestinale, un déclin du titre viral est observable très rapidement (Annexe 1 et Figure 15). Dans ce cas, c'est le virus résiduel non encore éliminé par digestion qui est mesuré (Franz *et al.*, 2015). Au contraire, lorsque l'infection est possible, le virus commence sa multiplication. Une phase de multiplication intense va se produire dans tout l'épithélium intestinal à partir de 4 jours post-infection (Jpi) et durant environ 28 Jpi, avant de connaître une longue phase de maintien chez le couple *O. porcinus*–Chiredzi/83/1 comme le décrit Kleiboeker (n°14). C'est d'ailleurs la seule étude où une cinétique relativement sigmoïde est observable (Annexe 1). Dans d'autres études, la phase de multiplication est plutôt linéaire, comme cela a pu être observé jusqu'à 80 Jpi dans l'étude n°2 sur *O. erraticus* avec une augmentation de $10^{0,65}$ HAD₅₀/tique par semaine pour le couple *O. erraticus*–Ourt88/1 et de $10^{1,36}$ HAD₅₀/tique pour le couple *O. erraticus*–Georgia/2007/1 (Annexe 1 et Figure 15). L'étude du couple *O. porcinus*–QET montre également une longue phase de multiplication virale sur 134 Jpi mais de façon plus progressive (Figure 15) (Greig & Plowright, 1970). Cependant, moins d'un quart des cinétiques ont des courbes ayant des tendances positives (11/49). Ainsi, pour la majorité des couples étudiés, le virus atteint rapidement son maximum d'infection et se maintient ensuite à ce niveau, suggérant qu'il existe un équilibre entre la multiplication et la disparition du virus dans la tique. Pour 25/49 courbes de tendance, on observe même une légère diminution du titre viral moyen sur le long terme, bien que les tiques restent compétentes puisque beaucoup sont encore capables de transmettre le virus à 182 Jpi (Figure 15 et Tableau 8). Cette diminution est relativement faible étant donné que sur les 20 cinétiques disponibles sur au moins 100 Jpi, 16/20 perdent moins de 10 HAD₅₀/tique entre 61 Jpi et la fin de l'expérience (maximum 182 Jpi) et les 4 autres perdent moins de 10^2 HAD₅₀/tique. La diminution du titre viral dans les tiques infectées, due certainement à une disparition progressive du virus, pourrait expliquer le faible taux d'infection observé dans plusieurs populations naturelles de tiques alors que les infections réalisées en laboratoire présentent généralement un fort taux d'infection, tout au moins sur les premiers mois (articles n°22, 26 et Plowright, 1977, Thomson *et al.*, 1983). Cette hypothèse semble se confirmer lors de suivis à long-terme en laboratoire. Ainsi, les publications de Endris en 1991 (n°20) sur le couple *O. puertoricensis*–DRII et en 1992 (n°18) sur *O. erraticus*–Portugal/86 montrent que le taux d'infection d'une population de tiques infectées en tant que larves sur porc virémique décroît au fur et à mesure du temps et des transformations jusqu'au stade adulte. Il passe de 100 % en tant que larve–Ny2 et décroît vers 30 % en tant qu'adulte. Ce constat est aussi visible mais dans une moindre proportion dans d'autres publications (n°8, 31 et Ribeiro *et al.*, 2015).

L'analyse des courbes de tendance présentées en Figure 15 permet aussi de suggérer 3 effets majeurs pouvant influencer l'évolution de la compétence vectorielle.

D'une part, l'importance du couple tique-virus dans le succès de la compétence vectorielle est confirmée. En effet, avec une même méthodologie d'infection et de suivi, l'étude n°1 montre que suivant la souche virale utilisée, la cinétique de multiplication virale n'est pas forcément la même. Le titre viral augmente pendant toute la durée de l'étude pour le couple *O. moubata*–Liv/13/33 alors qu'il diminue par exemple avec les couples *O. moubata*–Brazil/78 et *O. moubata*–Malta/78. L'étude de Kleiboeker n°12 montre le même effet pour le couple *O. porcinus*–Pretoriuskop/96/4/1 qui présente une cinétique croissante du titre viral dans les tiques, alors que dans le même temps, le couple *O. porcinus*–MwLil/20/1 présente une cinétique décroissante rapide.

Le second effet est lié à la méthodologie d'étude elle-même. Ainsi, on observe une augmentation plus rapide des titres viraux chez la tique *O. erraticus* étudiée dans l'article n°2 (Díaz *et al.*, 2012) que chez les autres auteurs utilisant cette espèce de tiques. C'est particulièrement vrai si on compare la courbe de tendance obtenue pour le couple *O. erraticus*–Ourt/88/1 réalisée dans l'étude n°2 et celle réalisée dans les études de Boinas (n°15 et Ribeiro *et al.*, 2015). Dans les deux cas, la même souche virale Ourt/88/1 est utilisée à des titres viraux infectieux similaires, (respectivement un essai entre 10^4 et 10^6 et un essai à $\geq 10^6$ HAD₅₀/ml) en gorgement artificiel sur membrane, les tiques *O. erraticus* ont été collectées dans la même région du Portugal à 10 ans d'intervalle et le virus a été titré suivant le même protocole. La seule différence méthodologique détectée est l'ajout d'antibiotiques dans le sang du gorgement infectieux dans l'article n°2. L'effet potentiel de ce choix méthodologique, ainsi que d'autres biais dus aux techniques mises en œuvre pour tester et mesurer la compétence vectorielle, est discuté par la suite.

Enfin, si la dose infectante a été démontrée pour jouer un rôle certain dans le taux d'infection des tiques, il semblerait au vu des courbes de tendance de l'Annexe 1 et de la Figure 15 qu'elle joue un rôle moins important sur la persistance du virus dans les tiques. En effet, que ce soit chez *O. erraticus* ou *O. porcinus*, les cinétiques obtenues pour les fortes doses et les doses moyennes se confondent à partir de 30 jours. De plus, bien que les courbes de tendance des faibles doses démarrent généralement à plus bas titre que les autres, elles montrent ensuite une évolution similaire (aussi bien croissante, constante ou décroissante).



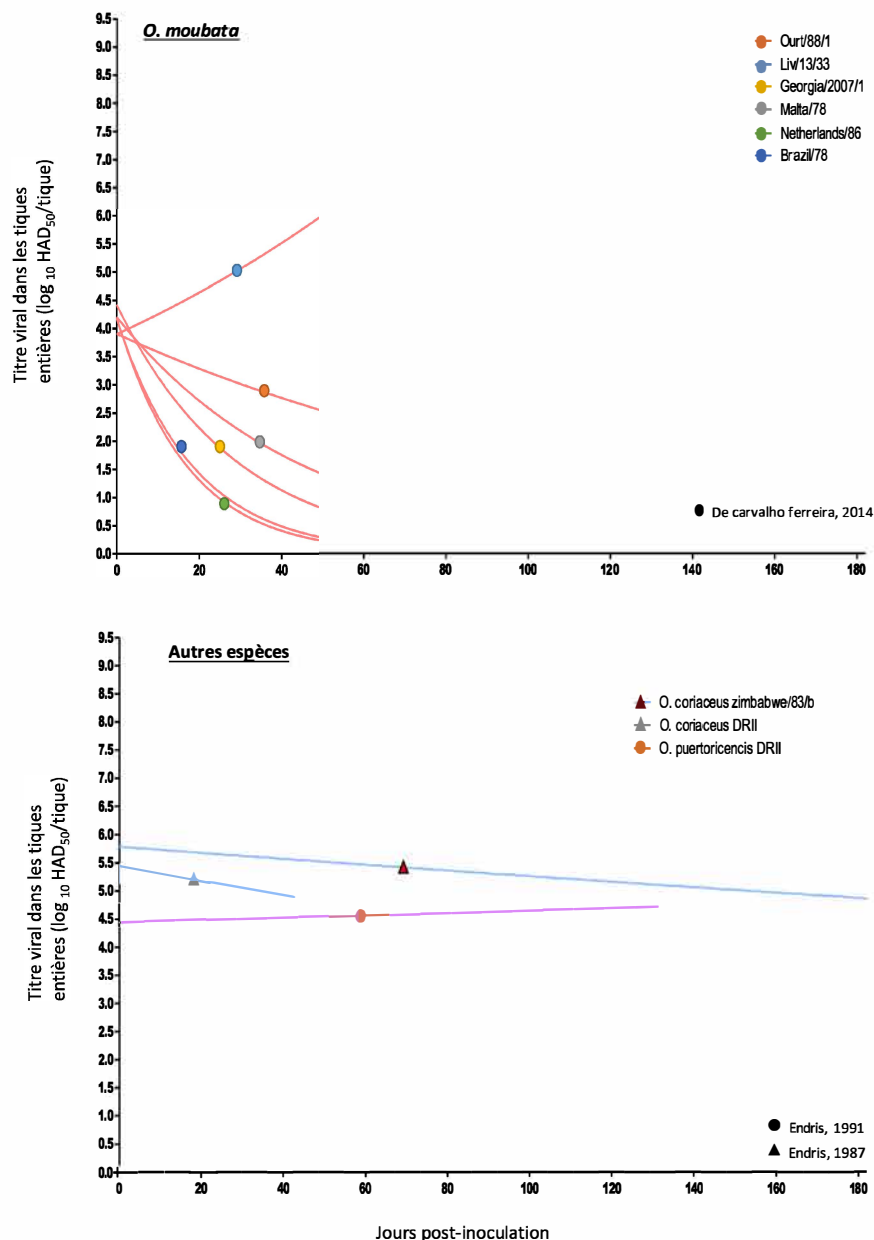


Figure 15 : Courbes de tendance des cinétiques de multiplication virale pour différentes souches de virus de la PPA (une courbe par souche) dans différentes espèces de tiques (un graphique par espèce) sur 182 Jpi. Les valeurs ont été trouvées dans la littérature de référence en compétence vectorielle (16 articles). D'après nos hypothèses *a priori* concernant la multiplication virale dans les tiques *Ornithodoros*, une courbe de tendance exponentielle a été appliquée sur chaque cinétique. Le titre moyen par tique infectée est reporté en ordonnée, à différents temps entre 0 et 182 Jpi en abscisse. Le ton des courbes concernant les espèces *O. erraticus* et *O. porcinus* correspond à la dose de virus dans le sang de gorgement infectieux (courbes foncées pour un titre $\geq 10^6$ HAD₅₀/ml de sang, courbes de ton intermédiaire pour les titres compris entre 10^4 HAD₅₀/ml et 10^6 HAD₅₀/ml de sang, et courbes claires pour les titres $< 10^4$ HAD₅₀/ml de sang). La dose de virus dans le sang de gorgement infectieux pour les autres espèces de tiques était $\geq 10^6$ HAD₅₀/ml de sang.

3. Pathogénicité du virus chez la tique

La persistance de l'infection à long terme dans la tique implique une réplication virale continue dans les différents tissus de la tique, associée à une cytopathologie minimale (article n°8). Cependant, certaines études font mention d'un taux de mortalité supérieur chez les tiques infectées par rapport aux mêmes tiques saines, avec une certaine variabilité selon les souches virales (Tableau 7). Au vu des études n°11, 12, 17, 18, 20, 22, 24, 27, 29, 30 et 32 les stress physiologiques naturels, comme l'oviposition ou le gorgement, semblent jouer sur la surmortalité des tiques infectées. Ainsi, l'énergie dépensée lors de la maturation des œufs et de la ponte fatiguerait davantage les tiques infectées. En outre, l'article n°11 de Rennie suggère que la paroi intestinale serait fragilisée par l'infection et se romprait plus facilement chez les tiques infectées lors d'un nouveau gorgement. La tique serait donc face à un compromis à réaliser entre la dépense énergétique pour maintenir son infection virale à un taux compatible avec sa survie et le coût énergétique à la réalisation de son cycle de développement.

Peu d'auteurs ont étudié les mécanismes viraux sous-jacents de pathogénicité chez la tique. Toutefois, l'article n°12 de Kleiboeker met en évidence une surmortalité des cellules de l'épithélium intestinal d'*O. porcinus* infectées par la souche MwLil/20/1. Il s'avère que cette souche virale n'est pas capable d'infecter des tiques par gorgement.

Enfin, des mesures effectuées sur les autres traits d'histoire de vie des tiques (période de pré-mue, fréquence de gorgement, durée et succès d'oviposition) n'ont pas montré d'effet de l'infection du virus de la PPA chez *O. moubata*, *O. erraticus* ainsi que chez *O. puertoricensis* (articles n°14, 17 et 18). Au final, la mortalité des tiques a été mesurée dans les articles de référence seulement pour 15/45 couples tique-virus et une mortalité anormale des tiques infectées a été observée pour 9/15 couples.

Tique	Virus	% mortalité des tiques infectées	% mortalité des tiques témoins	Stade	Référence
<i>O. moubata</i>	VIC/T90/1	13,8 à 92,9	4 à 8,7	Ad	N°11 Rennie, 2000
	LIV/13/33	9,1 à 80	4 à 8,7	Ad	N°11 Rennie, 2000
<i>O. porcinus</i>	Uganda/61	ND	ND	Ad	N°28 Plowright, 1974
	Zimbabwe/83/a	5 à 40	0 à 10	Ad	N°22 Hess, 1989
	KWH/12	70 % sur 38 semaines	ND	Ad	N°28 Plowright, 1974
	Pretoriuskop/96/4/1	1,9 à 11	2,9	Ny2 - Ny3	N°13 Kleiboeker, 1998
	Chiredzi/83/1	6,6	2,9	Ny2 - Ny3	N°13 Kleiboeker, 1998
<i>O. erraticus</i>	Portugal/86	17 à 73,1	8,8	Tous	N°16 Endris, 1994 et N°18 Endris, 1992
	Zimbabwe/83/a	8 à 26	0 à 8	Ad	N°22 Hess, 1989
	Tomas/87	Pas importante	ND	Tous	N°15 Boinas, 1994
<i>O. coriaceus</i>	DRII	40	3	Ny- Ad	N°24 Hess, 1987
	Lisbon/60	40 à 80	3	ND	N°27 Grocock, 1980
	Tengani/62	19	3	Ny- Ad	N°24 Hess, 1987
	Zimbabwe/82	36	3	Ny- Ad	N°24 Hess, 1987
<i>O. puertoricensis</i>	DRII	43,2	23,1	Tous	N°17 Endris, 1992 (1)

Tableau 7 : Tableau récapitulatif des données de mortalité de tiques infectées par le virus de la PPA disponibles dans la littérature de référence.

Ad : adulte, Ny : nymphe, ND : Données Non Décrites. (1) l'étude montre un taux de mortalité de 55,3 % entre les stades Ny2 et Ny3, mais un total de 43,2 % tous stades confondus.

E. Transmission du virus par les tiques

Plusieurs voies de transmission du virus de la PPA par les tiques *Ornithodoros* ont été identifiées : la transmission par la salive, et les transmissions sexuelle, transovarienne et transtadiale. Trois autres voies de transmission marginales ont été discutées ou rapidement étudiées par certains auteurs : le co-feeding, la transmission via les fèces et la régurgitation (article n°12, 14 et 31). Elles sont décrites plus en détail dans la suite de ce chapitre. Le modèle tique *Ornithodoros*–virus de la PPA présente un dernier mode de transmission non observé chez d'autres vecteurs : la transmission par la sécrétion de liquide coxal infecté (article n°13, 18 31). Ces différentes voies peuvent être scindées en deux catégories de transmission, qui présentent chacune des conséquences différentes. La première, la transmission horizontale aux suidés permet l'expansion géographique rapide du virus de la PPA dans la nature s'il n'est pas contenu. La seconde, la transmission de tique à tique, verticale ou horizontale, permet une persistance du virus de la PPA sur le long terme dans la population de vecteurs et particulièrement grâce à la transmission entre générations. Ce sont ces transmissions, au sein de la population du vecteur, qui confère à la tique sa faculté d'être aussi un réservoir du virus de la PPA.

1. La transmission horizontale par les tiques aux suidés

* Sécrétion de fluide coxal ou liquide coxal

Le liquide coxal est sécrété par une paire de glandes coxales, situées entre les deux premières paires de pattes (Figure 14 et Figure 16), au cours ou après le repas sanguin selon l'espèce de tiques *Ornithodoros* (Kaufman *et al.*, 1981). Il sert à réguler l'homéostasie de la tique par le rejet d'ions et de liquide provenant de l'hémolymphe (Kaufman *et al.*, 1982). La durée de sécrétion est comprise entre 60 à 90 minutes et le volume sécrété dépend de la concentration osmotique et du volume de sang absorbé (Kaufman *et al.*, 1981). Endris (n°18) estime la sécrétion à un tiers du repas sanguin moyen. Ce n'est pas une sécrétion anodine, puisqu'elle peut atteindre 120 µl chez certaines femelles *O. moubata* (Kaufman *et al.*, 1981).

Plusieurs études ont démontré la présence du virus de la PPA dans les glandes coxales et dans le liquide coxal des tiques *Ornithodoros* (articles n° 29, 31 et 32 et Kleiboeker & Scoles, 2001). En raison des titres viraux importants détectés dans le liquide coxal, jusqu'à $10^{4,2-4,8}$ HAD₅₀/ml (articles n° 13 et 31), et des quantités sécrétées, le liquide coxal a probablement un rôle non négligeable dans la transmission du virus de la PPA. Le virus présent dans cette sécrétion pourrait être introduit dans la peau des suidés grâce aux lésions cutanées laissées par les tiques après leur gorgement, en particulier lorsque celui-ci se gratte à cause de l'inflammation créée par la morsure. Après avoir réalisé des essais à différentes doses virales sur des porcs scarifiés, avec une souche de virus de République Dominicaine de 1979, (McVicar, 1984) confirme la potentielle implication du liquide coxal dans la transmission au porc et estime qu'une dose de $10^{2,3}$ HAD₅₀/sécrétion suffit pour contaminer un porc lors d'une blessure.

La seconde possibilité de transmission virale par sécrétion de fluide coxal serait la contamination de tique à tique lors du gorgement. En effet, les tiques ont tendance à se regrouper, et à copuler, lors du gorgement et peuvent ainsi baigner dans le fluide coxal d'individus infectés (articles n° 14 et 28). Cependant la transmission du virus entre tiques par l'intermédiaire du fluide coxal reste anecdotique et non étudiée.

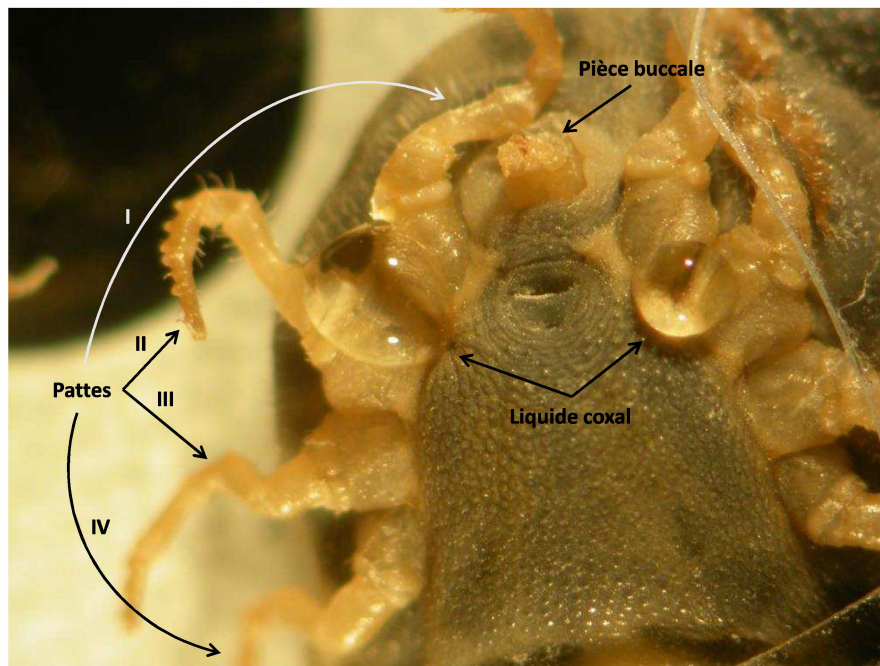


Figure 16 : Photographie d'une tique *O. moubata* femelle en train de sécréter du liquide coxal (J. Bernard).

* Sécrétion de salive

Même si les glandes coxales ont le rôle le plus important dans les régulations ioniques et aqueuses chez les tiques molles, les glandes salivaires y jouent également un rôle. En effet, les tiques sont capables de sécréter un type de salive hypersaline leur permettant d'absorber l'humidité de l'air. Elles peuvent ainsi réguler leur hydratation entre deux repas de sang (Francischetti *et al.*, 2009). Durant ce dernier, la salive a un autre rôle. Les protéines contenues dans la salive contribuent à conserver l'ouverture créée dans le derme à l'aide des molécules inhibitrices de l'agrégation des plaquettes. Elles aident à l'acquisition du sang grâce à la sécrétion de molécules anticoagulantes et enfin, elles protègent la tique de la réponse immunitaire au moyen de molécules régulant l'immunité de l'hôte (mécanisme décrit plus en détails dans le chapitre 3).

La sécrétion de salive est une voie de passage pour de nombreux parasites. Le virus de la PPA a déjà été détecté dans les glandes salivaires (articles n° 12 et 29). Kleiboeker (n°12) a montré aussi que des virions et des usines virales sont observables dans les granules sécrétoires des glandes salivaires. Enfin, d'autres études (n°13, 29 et 31 et Plowright *et al.*, 1994) ont confirmé que le virus pouvait migrer vers les glandes salivaires, être sécrété par la salive et contaminer des porcs. Deux études précisent la gamme de sécrétion du virus dans la

salive. Elle augmenterait avec le temps entre $10^{0,8}$ et 10^2 HAD₅₀/ml de salive à 56 jours et jusqu'à 10^4 HAD₅₀/ml de salive à 84 jours, pour *O. porcinus* infectée par Chiredzi/83/1 (article n°13). Elle serait autour de $10^{2,7}$ HAD₅₀/tique chez *O. moubata* infectée par une souche ougandaise dans l'expérience de (Plowright, 1977), après injection de pilocarpine pour stimuler la sécrétion de salive. Le titre viral reste toutefois plus important dans les glandes salivaires que dans la salive, avec $10^{4,1}$ HAD₅₀/glande pour *O. porcinus* infectée par la souche Uganda/61 (article n° 29).

Chez les tiques dures, la salive intervient aussi lors de transmission par « co-feeding ». Ce mode de transmission correspond au passage d'un parasite d'une tique infectée à une tique non infectée lors d'un gorgement réalisé conjointement sur un même hôte sans que l'hôte ne soit virémique (Randolph, 2011). Techniquement, l'absorption de virus par une tique non infectée à l'endroit même où le parasite a été transmis est considérée comme du co-feeding. Cependant, le co-feeding est mentionné principalement lorsque la tique infectée et non infectée se retrouvent à une certaine distance l'une de l'autre. Des molécules de salive particulières sont à l'origine de ce mode de transmission, ce sont les « salive activated transmission » (SAT) (Nuttall & Labuda, 2004). Concernant les tiques molles, des preuves indirectes ont montré que *O. moubata* serait capable de réaliser du co-feeding lorsqu'elle est infectée par le virus West Nile (Lawrie *et al.*, 2004). Cependant une seule étude préliminaire, infructueuse, est disponible sur ce mode de transmission avec le virus de la PPA (Rennie, 1998).

Durant le repas de sang, un autre mode de transmission via les pièces buccales, la régurgitation, pourrait se produire de manière anecdotique et a été rapportée seulement par l'article n°13 et (Connat, 1991). Elle est possible au niveau anatomique grâce à la valve proventriculaire que possèdent les tiques. Ainsi, elles peuvent régurgiter occasionnellement un précédent repas sanguin infecté. Cependant, personne n'a jamais étudié ce phénomène pour le virus de la PPA ni n'a cherché à savoir si le virus régurgité serait capable d'infecter les porcs.

Excrétion de fèces

La dernière voie de TH possible est l'excrétion de virus par les fèces. L'intestin postérieur et les tubules de Malpighi produisent respectivement des résidus de repas sanguins non digérés provenant de l'intestin et des déchets, le tout transporté vers le sac rectal avant d'être éliminé (Sonenshine, 1991). Cette voie de contamination est probablement mineure, mais est possible puisque la détection de virus de la PPA dans les tubules de Malpighi a été confirmée par deux auteurs (n° 28 et 29) ainsi qu'un titre viral de $10^{2,7-3,1}$ HAD₅₀/excréta a pu être quantifié dans les fèces de *O. porcinus* infecté par le virus Uganda/61 (n° 31). Les fèces étant quelquefois excrétées lors du repas de sang, il suffirait qu'une petite quantité de virus viable persiste pour être transmis (n° 30 et Plowright, 1977, observation personnelle). Au même titre que la pénétration du liquide coxal dans une blessure cutanée, les fèces pourraient emprunter cette même voie d'entrée, surtout si elles se retrouvent mélangées au liquide coxal durant le gorgement (Plowright, 1977).

Résultats de transmission par les tiques aux suidés

Les différentes sécrétions (salive et fluide coxal) et excrétions de virus évoquées peuvent avoir lieu durant le gorgement des tiques infectées. Lors d'essais de transmission aux suidés, la réponse attendue par les auteurs est le développement ou non des symptômes de la maladie chez les suidés suite à la morsure de tiques infectées. Aucun auteur ne discute de la voie de transmission, car il est presque impossible de faire la différence entre l'une ou l'autre, même si la piste de la transmission par la salive semble privilégiée.

La durée de transmission via la salive semble pouvoir être effective sur une longue période de temps, 588 Jpi pour le couple *O. erraticus*–Portugal/86 (Tableau 8). Mais pour certains couples tique–virus, la transmission n'est plus effective à partir d'une certaine durée, par exemple 86 Jpi pour le couple *O. moubata*–Zimbabwe/83/a et 239 Jpi pour le couple *O. puertoricensis*–DRII.

Les sécrétions de salive pourraient aussi être fortement chargées en virus puisque quelques tiques, voire une seule dans l'étude n°31, suffisent à contaminer un porc par gorgement naturel de *O. porcinus* infectée par la souche KWH/12 (Tableau 8). La période d'incubation chez ce porc après le repas sanguin n'est que de 3 ou 4 jours, ce qui correspond à une dose inoculée d'environ 10^2 à 10^3 HAD₅₀ (articles n°30, 32 et Bernard *et al.*, 2015). Cependant l'action de la salive, plus largement décrite dans le chapitre 3, pourrait potentialiser l'infection et donc réduire la quantité de virus nécessaire à l'infection.

Tique	Virus	Stade	Nbr de tiques	Résultat de TH sur porc	Jpi	Références	Remarque
<i>O. erraticus</i>	Ourt/88/2	Lv – Ad	104, 255, 202 114, 280, 5	+, +, + +, -, -	228, 228, 278 380, 1162, 1711	N°3 Boinas, 2011	
	Ourt/88/1		12, 4 51, 8	-, - -, -	1038, 1178 1316, 2030		
	Ourt Portugal/86		24, 15 ND	-, - -, +	805, 867 342, sur 4 CG		
	Portugal/86	Ad, F	ND	-, +	342, sur 4 CG	N°16 Endris, 1994	après essai de TS
	Portugal/86	Ny1 – Ad	536, 355, 192 107, 77, 22 47, 16, 44 14, 24, 25	+, +, + +, +, + +, +, + +, +, +	28, 68, 96 155, 196, 254 260, 291, 310 387, 415, 588	N°18 Endris, 1992	
<i>O. porcinus</i>	Zimbabwe/83/a	Ny – Ad	90, >100, >100 95, >100, >100 >100, >100	+, -, - +, -, - -, -	86, 833, 859 39, 831, 857 831, 857	N°22 Hess, 1989	Tique de Victoria Falls
							Tique de Chiredzi
							Tique de Mbezi
	Chiredzi/83/1	Ny2, Ny3	19, 20, 48 18, 2, 5	+, +, + +, +, +	21, 48, 71 92, 187, 187	N°13 Kleiboeker, 1998	
	Crocodil/96/1		20	+	54		
	Pretorius-kop/96/4/1		20	+	54		
	Nooitver-wacht/96/6		20	+	54		
	KWH/12	F	12	+	ND	N°28 Plowright, 1974	dans le fluide coxal, après TS
	KWH/12	F	1 1 1	4/4 + 2/2 + 3/3 +	ND, 56, 90, 112 ND, 50 ND, 38, 72	N°31 Plowright, 1970	Jpi minimum car échantillonnage de terrain
			8, 10, 4 8, 9, 5	+, +, + +, +, +	TOT		
			Ny2-3	6, 6, 2	+, +, + TOT		
	Uganda/61	F	1 1 1 1 1 1	5/5 + 7/7 + 3/3 + 0/5 - 0/3 - 7/7 +	123 à 238 123 à 412 137 à 314 123 à 314 137 à 189 123 à 469	N°30 et 31 Plowright, 1970	Suivi individuel de gorge-ments successifs sur porc. 5/5+ signifie que les 5 gorge-ments du même individu ont abouti à une transmission du virus.
			1	0/3 -	137 à 189		
			1	7/7 +	123 à 469		
			1	0/3 -	137 à 189		
			Ny	groupe	42/43 + 21 à 310		
	Tengani/62	Ny2 – Ad	2 à 40	5/5+	jusque 19 semaines	N°32 Plowright, 1969	
	Uganda/61		3 à 24 1	21/21+ 16/16+	3 à 13 jusque 34 semaines		
<i>O. puertoricensis</i>	DRII	Ny2 – Ad	746, 422, 205 214, 17, 79 52, 31, 16	+, +, + +, +, + -, -, -	23, 85, 126 160, 182, 239 289, 398, 506	N°20 Endris, 1991	
<i>O. coriaceus</i>	DRII	Ny – Ad	ND	-, +, +, +, +, +, + +, +, -	15, 21, 81, 145, 345, 440, 502 86, 212, 232	N°24 Hess, 1987	
	Tengani/62			+, +, -	169, 245		
	Zimbabwe/82			+, +	169, 245		
	Uganda/61	Ny1 – Ad	4, 12, 6 13, 10, 12	-, -, - -, -, -	49, 97, 118 22, 43, 118	N°27 Grocock, 1980	
	Lisbon/60		8, 6, 2, 25	+, -, -, +	22, 77, 42, 63		
<i>O. parkeri</i>	Zimbabwe/82	Ny tardif	160, 70	-, -	49, 70	N°27 Grocock, 1980	
<i>O. turicata</i>	Unknown	ND	ND	- +	ND 23	N°27 Grocock, 1980	Ot1 > 25 ans Ot2 > 5 ans
<i>O. savignyi</i>	Malta/78	Ny1 – Ad	ND, 35	-, +	32, 98	N°25 Mellor, 1985	Transmission sur membrane
	Liv/13/33	Ad, Ny 4-5, F F, F, Ad-Ny	57, 8, 3 7, 5, 10	+, +, - +, +, -	50, 106, 106, 106, 106, 106		

Tableau 8: Tableau récapitulatif des publications où la transmission horizontale (TH) du virus aux porcs par les tiques *Ornithodoros* a été testée.

La lecture du Tableau se fait comme suit : *O. erraticus* (colonne 1) infectée par la souche Ourt/88/2 (colonne 2), tous stades confondus (colonne 3), 104 tiques (colonne 4) ont réussi à transmettre le virus aux porcs (colonne 5) à 228 Jpi (colonne 6), 255 tiques (colonne 4) ont réussi à transmettre le virus (colonne 5) à 228 Jpi (colonne 4) , et ainsi de suite ; Pour les lignes comme *O. porcinus* et le virus Kwh/12, il faut lire qu'1 femelle a réussi à transmettre le virus 4 fois sur 4 essais de transmission entre un minimum non déterminé et un maximum d'au moins 112 Jpi. Lv : larve, Ad : adulte, Ny : nymphe ; F : femelles ; Jpi : jours post-gorgement infectieux ; TOT : tiques infectées provenant d'une transmission transovarienne ; + transmission réussie, les porcs sont morts de la maladie ; - transmission échouée ; ND : données Non Décrites

2. Les modes de transmission entre tiques

* Transmission transtadiale (Tableau 9)

La première étude à confirmer la TST du virus a été publiée par Plowright n° 32 sur des tiques *O. porcinus* de Tanzanie expérimentalement infectées par la souche Uganda/61 et dans une moindre mesure avec la souche Tengani/62. L'auteur a démontré que les tiques infectées pouvaient transmettre le virus à des porcs cinq à six fois au cours de leur développement, du stade de nymphe 1 au stade adulte. Il a aussi noté que ce mode de transmission avait un taux de réussite de presque 100 % pour *O. porcinus* (article n°30), ce qui fut plus tard confirmé par Kleiboeker en utilisant la souche Chiredzi/83/1 (article n°13). La TST fut également confirmée sur des tiques *O. porcinus* de terrain de stade précoce collectées en Tanzanie. Des nymphes de premier stade non gorgées avaient été retrouvées infectées probablement par la souche KWH/12, ce qui signifiait que les larves du stade précédent, qui n'ont biologiquement pas besoin de repas sang pour muer en nymphes, étaient déjà contaminées (Plowright, 1977). En 2000, Rennie a réussi à démontrer des cas de TST naturelle et expérimentale de PPA chez la tique *O. moubata* en utilisant respectivement les souches VICT/90/1 et LIV/13/33 (Rennie *et al.*, 2000).

En Europe, la TST a été aussi démontrée chez *O. erraticus* au travers d'infections expérimentales du stade larvaire jusqu'au stade adulte en utilisant la souche Portugal/86 (Endris *et al.*, 1992b). Cependant, le taux d'infection chute de près de 70 % pendant le développement entre les stades immatures et les stades adultes.

En ce qui concerne les autres espèces de tiques, la transmission du virus des stades nymphaux à adulte a été également démontrée de façon ponctuelle pour des tiques *O. coriaceus* en utilisant 4 souches virales d'Europe, d'Afrique et de la République Dominicaine (articles n°24 et 27), *O. savignyi* avec deux souches européennes (article n° 25), et *O. puertoricensis* avec une souche de la République Dominicaine (articles n°20 et 24). Cependant, tous les auteurs observent un taux de transmission faible et non homogène avec un déclin particulier chez *O. puertoricensis* après chaque mue (articles n°19 et 20). Pour l'espèce *O. parkeri*, l'étude n°24 montre que le titre viral commence à décliner dès 49 jours et que le taux d'infection dans les populations de tiques (9/25 tiques) est faible après 70 jours. Les essais de transmission sur les porcs à 49 et 70 jours ont d'ailleurs échoué.

Tique	Virus	Conditions				TST	Références
		Infection	Nbr de repas	Stade	Temps de l'étude		
<i>O. moubata</i>	Liv/13/33	E	3	Ny1 → Ad	> 61 à ≤181	+	N°11 Rennie, 2000 et N°14 Rennie, 1998
	Vict/90/1	E	3	Ny1 → Ad	> 61 à ≤181	+	
<i>O. porcinus</i>	Zimbabwe/83/a	N	1 à 3	Lv → Ad	> 182	+	N°22 Hess, 1989
	tengani/62	E	4 à 6	Ny2 → Ad	> 61 à ≤181	+	N°32 Plowright, 1969
	Kwh/12	N	1 à 3	Lv → Ny3	> 61 à ≤181	+	N°30 Plowright, 1970
	Uganda/61	E	1 à 9	Ny1 → Ad	> 182	+	N°31 Plowright, 1970 et N°32 Plowright, 1969
	ND	N	0	Lv → Ny1	ND	+	(Plowright, 1977) (1)
<i>O. erraticus</i>	Zimbabwe/83/a	E	1 à 3	Lv → Ad	> 182	+	N°22 Hess, 1989
	Portugal/1986	E	12	Lv → Ad	> 182	+	N°19 Endris, 1992
<i>O. coriaceus</i>	Zimbabwe/82	E	2	Ny2 → Ad	> 182	+	N°24 Hess, 1987
	DRII	E	7	Ny2 → Ad	> 182	+	N°24 Hess, 1987
	Lisbon/60	E	1	Ny3 → Ny5	> 60	+	N°27 Groocock, 1980
	Tengani/62	E	3	Ny2 → Ad	> 182	+	N°24 Hess, 1987
	Uganda/61	E	1 à 2	Nys	> 61 à ≤181	-	N°27 Groocock, 1980
<i>O. savignyi</i>	Malta/78	E	3	Ny1 → Ad	> 61 à ≤181	+	
	Liv13/33	E	1 à 2	Ny1 → Ad	> 61 à ≤181	+	N°25 Mellor, 1985
<i>O. puertoricensis</i>	DRII	E	10	Ny1 → Ad	> 182	+	N°20 Endris, 1991

Tableau 9 : Tableau récapitulatif des publications où la transmission transtadiale a été étudiée.

E : infection expérimentale en laboratoire ; N : échantillonnage de terrain ; Transmission transtadiale : + réalisée ; - jamais observée ; ND : Données Non Décrites ; (1) Découverte de Ny1 du terrain jamais gorgées, mais positives au virus, article ne faisant pas partie des 32 articles de références. Le virus a été détecté soit par titrage dans les tiques, soit lors d'un essai de transmission sur porc.

* Transmission sexuelle (ou vénérienne) (Tableau 10)

Selon (Plowright *et al.*, 1974), la transmission sexuelle du mâle à la femelle est un processus général pour la transmission de la PPA par les tiques *Ornithodoros*. Cependant, il a été démontré expérimentalement sur seulement deux espèces, *O. porcinus* et *O. erraticus* et 10 couples chacune, à travers 3 cycles gonotrophiques (CG) (cycle représenté par un gorgement suivi d'une ponte). En utilisant les souches Uganda/61 et KWH/12, l'article de Plowright n°28 a montré que les mâles d'*O. porcinus* préalablement infectés peuvent transmettre le virus de la PPA avec un taux de 87-89 % quand la copulation est confirmée pour la 3^e fois par la présence de spermatophores sur la femelle (57 % de transmission à la 2^e copulation et 0% à la première). Les femelles réussissent alors à infecter des porcs par gorgement après une période d'incubation extrinsèque dans la tique d'au moins 8 à 21 jours. Ce laps de temps est le délai nécessaire au virus pour se généraliser dans la tique de l'utérus à l'hémocèle et aux autres tissus (article n°13). En 1994, avec la souche Portugal/1986, Endris (n°16) a aussi démontré que la TS est possible chez *O. erraticus* du mâle à la femelle via la copulation ; cependant le taux de transmission était faible (10 %) sans augmentation après plusieurs CG. L'auteur conclut qu'un tel mode de transmission est un événement rare chez

cette espèce, peut-être dû à une barrière intrinsèque importante à l'infection de l'appareil reproductif par le virus de la PPA chez les mâles et les femelles.

Tique	Virus	Sens de transmission	Détection du virus dans les tissus suite à la transmission		% de réussite par CG		Référence
			Titre HAD ₅₀ /tique	Méthode de détection	1 CG	2 et 3 CG	
<i>O. moubata</i>	Liv/13/33	organes	ND	H	ND	ND	N°14 Rennie, 1998
<i>O. porcinus</i>	Uganda/61	♂→♀	traces - 4,7	T	81 %	89 %	N°28 Plowright, 1974
	Kwh/12	♂→♀			89 %	89 %	
	Uganda/61	♀→♂			0	0	
	Kwh/12	♀→♂			0	1/14 (1)	
	ND	♂→♀	ND	ND	10 à 90 %	ND	(Kleiboeker & Scoles, 2001) (2)
	Uganda/61	organes	traces -3,5	IF + T	ND	ND	N°29 Greig, 1972
	Chiredzi/83/1	organes	1 à 5,8 augmente avec le temps	H + T	ND	ND	N°13 Kleiboeker, 1998
	Pretoriuskop/96/4/1						
	Crocodil/96/1						
	Nooitverwatcht/96/6	organes	0 à 3 (suite inoculation à la seringue)	T	ND	ND	N°13 Kleiboeker, 1998
	MwLil/20/1						
<i>O. erraticus</i>	Portugal/1986	♂→♀	ND	T	10 %	0	N°16 Endris, 1994
	Portugal/1986	♀→♂	ND	T	0	0	
	Tomar/87	♂→♀	ND	T	20 %	ND	N°15 Boinas, 1994

Tableau 10 : Tableau récapitulatif des études sur la transmission sexuelle.

Les tissus reproducteurs dépendent des études : organes sexuels mâles et femelles, séparés ou ensemble. Méthode de détection du virus après dissection ou sur tique entière. H : coupe histologique ; IF : Immunofluorescence ; T : titrage ; CG : cycle gonotrophique ; ND : Données Non Décrites ; (1) : l'auteur suggère que la contamination serait due au liquide coxal sécrété par la femelle et non à une contamination par voie sexuelle. (2) article ne faisant pas partie des 32 articles de références.

* Transmission transovarienne (ou filiale) (Tableau 11)

Ce mode de transmission ne doit pas être confondu avec la contamination de la surface externe des œufs lors de leur déplacement à travers le tractus génital infecté de la femelle, des ovaires jusqu'au pore génital. La TOT doit être démontrée par la contamination de la progéniture et non de l'enveloppe des œufs (Rennie *et al.*, 2001). Chez les tiques *Ornithodoros*, la répllication du virus de la PPA dans les tissus ovariens a été clairement démontrée chez *O. porcinus* infecté par les souches virales Uganda/61, KWH/12, Chiredzi/83/1, Pretoriuskop/96/4/1, Crocodil/96/1 et Nooitverwatcht/96/6 (articles n°13 et 29) mais les mécanismes par lesquels le virus pénètre dans les cellules germinales et les oogones en traversant les différentes membranes tissulaires sont toujours inexpliqués (Rennie, 1998).

Plowright (n°30) a été le premier à montrer la TOT naturelle du virus de la PPA, en même temps que la TST discutée plus haut, en détectant l'infection du virus Uganda/61 dans des nymphes de premier stade d'*O. porcinus* collectées dans la nature. Il a aussi démontré que les larves et les nymphes de premier stade, provenant de pontes infectées et produites par des femelles *O. porcinus* collectées dans la nature et probablement infectées par la souche KWH/12, sont capables de transmettre le virus aux porcs par gorgement. Toutes les souches de virus ne semblent toutefois pas capables de se transmettre par cette voie. Par exemple, *O. porcinus* infectée par des souches d'Uganda/61 et KWH/12 n'a jamais réalisé de TOT (article n°28). Cependant lorsque la TOT se produit, le taux d'infection filiale, c'est-à-dire le nombre de descendants infectés, peut atteindre au moins 50 % et le taux de transmission, soit le nombre de femelles qui transmettent le virus, peut atteindre plus de 90 % pour certaines colonies d'*O. porcinus* comme l'indique l'article n°30 et (Kleiboeker & Scoles, 2001).

Chez *O. moubata*, la TOT a été démontrée expérimentalement par Rennie en 2001 (n°10) avec les souches Vict/90/1 et Liv/13/33. L'auteur a observé une augmentation du taux de transmission du virus des femelles à leurs descendances à travers les différents cycles gonotrophiques passant d'un taux de transmission nul lors du premier repas de sang (infecté) jusqu'à 21 % lors du troisième repas (non infecté) et un taux de femelles transmettant le virus qui augmente également jusqu'à 80 % après le 3^e repas. Le taux d'infection filiale connaît aussi des gammes de variations considérables entre les femelles infectées, entre 1 à 54 %. De façon assez commune chez les tiques, les œufs de la première ponte après le repas infectant des tiques contiennent rarement du virus (Burgdorfer & Varma, 1967).

Contre toute attente, plusieurs études n'ont pas réussi à démontrer la TOT du virus de la PPA chez *O. erraticus*, bien que cette espèce soit considérée comme un bon vecteur et réservoir du virus (articles n°20 et 22). En utilisant la souche Portugal/86, Endris (n°20) a infecté expérimentalement des femelles *O. erraticus* et a testé leurs progénitures aux stades larvaire et nymphal pendant cinq cycles gonotrophiques. Il n'a jamais pu observer d'infection des porcs après gorgement des tiques ni détecter du virus dans les tiques. Comme pour la TS, l'auteur suggère qu'il existe chez cette espèce une barrière intrinsèque ovarienne encore infranchissable pour le virus.

La TOT n'a pas été démontrée chez d'autres espèces pouvant transmettre le virus aux porcs par TH. Ainsi, *O. coriaceus* infectée avec des souches de virus africaines, européens et la souche DR11 ainsi que l'espèce *O. savignyi* avec la souche de virus Malta/78 et Lisbon/60 n'ont pas montré de TOT (articles n°23, 25 et 27). Cependant la TOT a été observée pour la souche DR11 chez l'espèce *O. puertoricensis* alors qu'elle n'est pas considérée comme faisant partie des espèces « classiques » vectrices du virus (article n°25). Cette différence pourrait s'expliquer par une capacité différente à transmettre le virus de la PPA suivant les espèces,

mais aussi par des biais méthodologiques. Certains auteurs ne semblent pas attendre assez longtemps pour laisser le virus se généraliser dans la tique et infecter les organes sexuels, en ne testant pas les couples tique–virus sur plusieurs cycles gonotrophiques. C’est notamment le cas pour Groocock (n°27) qui teste la TOT sur moins de 50 jours avec l’espèce *O. coriaceus*. Cette espèce est pourtant considérée comme un vecteur et réservoir potentiel capable de conserver le virus et de le transmettre sur plus de 500 jours (articles n°24).

Tique	virus	TOT	Nbr de ♀	Jpi des ♀	Taux de transmission par CG (1)			Taux d'infection filiaire par CG (2)					Essai de TH de la descendance	Références
					1	2	3	1	2	3	4	Lv ou Ny1		
<i>O. moubata</i>	MIC T90/1	+	29	28 à 158	ND	8,9 % pondus par 4,8 % ♀	21,1 % pondus par 75 % ♀	ND	1,8 à 31,8 % (↗ 3,1 HAD)	15 à 32,4 % (↗ 3,6 HAD)	ND	ND	ND	N°11 Rennie, 2000, et N°14 Rennie, 1998
	LIV 13/33	+	33	42 à 165	ND	9,9 % pondus par 28 % ♀	20,9 % pondus par 80 % ♀	ND	1,2 à 32,5 % (↗ 3,8 HAD)	1,7 à 54,5 % (↗ 5,1 HAD)	ND	ND	ND	
<i>O. porcinus</i>	KWH/12	+	3	ND	ND	1/3 pontes (↗ 4,1 HAD)	1/2 pontes (↗ 4,3 HAD)	3/3	2/3	2/2	1/1	55 à 81 % (↗ 4,9 HAD)	+ Ny1 à Ny3	N°30 Plowright, 1970
	Uganda/61	-	51	ND	ND	ND	ND	-	-	-	ND	-	-	N°28 Plowright, 1974 (3)
	KWH/12	-	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	
	Zimbabwe /83/a	+	134	en Ny	ND	ND	ND	100%	+	+	ND	ND	ND	N°22 Hess, 1989
	ND	+	ND	ND	0 (2)	15% (2)	ND	55,30%	ND	ND	ND	ND	ND	(Kleiboeker & Scales, 2001) (4)
<i>O. spp east + south africa</i>	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	55 à 80 %	ND	ND	ND	0,15 à 1,54 %	ND	(Plowright, 1977) (4)
<i>O. erraticus</i>	Portugal/86	-	18	en Lv	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	N°16 Endris, 1994
	-	-	100	en Ad	ND	ND	ND	-	-	-	ND	-	-	
	Zimbabwe /83/a	-	100	ND	ND	ND	ND	-	-	-	-	ND	ND	N°22 Hess, 1989
<i>O. puertoricensis</i>	DRII	+	30	en Ny2	4/256 pool d'œufs	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	N°24 Hess, 1987
<i>O. coriaceus</i>	Uganda/61	-	4	49	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	-	N°27 Groocock, 1980
	Lisbon/60	-	4	18	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	
	DRII	-	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	N°24 Hess, 1987
<i>O. savignyi</i>	Liv/13/33	-	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	N°25 Mellor, 1985

Tableau 11 : Tableau récapitulatif des publications de référence étudiant la transmission transovarienne du virus de la PPA par les tiques *Ornithodoros*.

Nbr de ♀ : nombre de femelles utilisées dans l’expérience ; Jpi des ♀ : temps entre l’infection des femelles et l’étude de la TOT dans les pontes, « en » signifie que les tiques ont été infecté en tant que nymphe ou larve ; CG : cycle gonotrophique ; E : infection expérimentale ; F : infection naturelle ; Ad : Adulte ; Lv : Larve ; Ny : Nymphe ; ND : No data ; + : positif ; - : négatif ; ↗ : jusqu’à, dans les cas où le titre du virus dans les pontes ou les descendants est précisé ; (1) nombre de pontes infectées, pour l’étude sur *O. moubata*, il faut lire que 8,9% des pontes sont infectées et ont été pondues par 4,8% des femelles infectées (2) taux de descendants infectés par ponte ; (3) Essai de TOT après un essai de TS. (4) articles n’appartenant pas aux 32 articles de références Les titres viraux sont exprimés en HAD₅₀/tique.

F. Scénarios synthétiques de compétence vectorielle

Suite aux différents patrons de compétence que nous venons de mettre en avant, et en tenant compte à la fois des différentes mesures de compétence vectorielle réalisées par les auteurs et du taux de suivi des différents couples tique-virus, des scénarios reflétant le degré de compétence vectorielle des tiques *Ornithodoros* pour le virus de la PPA ont été déterminés.

Au total, cinq scénarios ont été créés, présentés dans le tableau 12 : 1- aucune infection des tiques par le virus, 2- infection des tiques, mais sans transmission du virus, 3- Infection des tiques et TH à court terme, 4- Infection des tiques et TH à long terme, 5- Infection des tiques et transmission TH ou/et transmission de tique à tique. Deux principaux seuils de durée ont été définis :

- Un premier seuil a été défini à 60 jpi pour confirmer le succès d'infection des tiques, basé sur 3 paramètres : 1) la durée minimale pour la digestion des repas de sang et son élimination totale du tractus digestif qui est d'environ 4 semaines selon (Rowlands *et al.*, 2009) ; 2) si l'infection des tiques n'est pas réalisée, le virus de la PPA n'est plus détecté après 4 semaines à l'aide des méthodes d'isolement viral (d'après l'article n°15) et de l'ADN viral ne semble plus pouvoir être détecté au-delà de 49 jours par des méthodes de qPCR (d'après l'article n°1) ; 3) lorsqu'une tique s'infecte, la multiplication du virus dans les tiques prend environ 30 à 56 jours et c'est le temps nécessaire pour traverser la barrière intestinale ainsi que celle des autres organes des tiques, d'après les articles n°2, 7, 13 et (Burrage, 2013). En conséquence, l'évaluation de la présence du virus à 60 jpi semblait être un bon compromis pour distinguer le succès d'infection des tiques d'un reste de virus résiduel dans l'intestin.

- Un second seuil a été défini à 182 jpi pour confirmer la persistance du virus à long terme dans les tiques et assurer au moins une transmission du virus. Au regard des articles n°7, 15 et 31 ainsi que (Wilkinson *et al.*, 1988), les stades tardifs des tiques y compris les adultes semblent être beaucoup plus susceptibles d'être infectés que les petits stades immatures ; après 24 à 32 semaines, la proportion de tiques à rester infectées a tendance à diminuer. En outre, sur la base des caractéristiques biologiques des tiques *Ornithodoros*, le renouvellement total des cellules de l'intestin est censé être achevé au bout de 6 mois (Burrage, 2013), ce qui suggère que le virus peut être totalement éliminé s'il ne parvient pas à franchir la barrière intestinale. Enfin, dans des conditions de terrain, la durée moyenne du cycle de développement des tiques est d'environ 6 mois (Boinas, 1994, Rennie, 1998, Vial, 2009), amenant de nombreuses occasions pour le virus d'être éliminé (par exemple à travers l'homéostasie après les repas de sang), mais aussi d'être transmis par plusieurs voies (selon

les articles n°14 et 15). En conséquence, 182 jpi semblait être une durée minimale pour valider l'infection à long terme des tiques et la transmission du virus.

Scénario	Infection des tiques	Propagation du virus dans les tiques		Maintien ou Multiplication du virus	Transmission		Conclusion sur la compétence
		Hémolymph	Glandes salivaires		aux porcs (HT)	aux tiques (TOT & ST)	
1	Non	Non	Non	Non < 60 jpi	Non	Non	Non
2	Oui	Oui	Non	Oui < 60 jpi	Non	Non	Non
3	Oui	Oui	Oui	Non < 182 jpi	Oui	Non	Oui
4	Oui	Oui	Oui	Oui > 182 jpi	Oui	Non	Oui
5	Oui	Oui	Oui	Oui > 182 jpi	Oui	Oui	Oui

Tableau 12 : Tableau des scénarios de compétence vectorielle des tiques *Ornithodoros* pour le virus de la PPA.

Selon les critères du tableau 12, des scénarios de compétence vectorielle (allant de 1 non compétent à 5 totalement compétent) ont été déterminés pour chaque couple tique-virus. Les résultats de cette classification sont présentés dans la Figure 17. Dans certains cas, comme avec *O. porcinus* avec la souche Crocodil/96/1 et la souche NooitVerwacht/96/6, la compétence vectorielle a été partiellement testée mais il a été possible de prédire le succès ou l'échec des transmissions horizontales et/ou verticales suite aux résultats de détection du virus ou de sa quantification dans les sécrétions (salive ou liquide coxal) ou dans les organes de tiques (glandes salivaires ou coxales, et les organes reproducteurs). Enfin, un total de 25 % des couples a obtenu une note de scénario définitif, et ce total monte à 65,9 % si l'on exclut les modes de transmission de tique-à-tique qui étaient les moins testés.

Malgré ces mesures partielles, la Figure 17 montre que la plupart des souches de virus ne sont testées qu'avec une seule espèce de tiques (24/45 couples), et parfois avec deux espèces (11/45 couples). La plupart des espèces d'*Ornithodoros* sont des vecteurs compétents pour au moins une souche de virus de la PPA. Un doute reste cependant sur les espèces *O. sonrai* et *O. parkeri*, qui n'ont pas été suffisamment testées pour conclure sur leur statut de compétence. Cependant, une grande hétérogénéité de scénarios peut être observée pour une même espèce de tiques, suivant la souche de virus étudiée. Par exemple, les tiques *O. moubata* infectées avec la souche LIV13/33 ont obtenu un scénario 5, alors qu'avec la souche Brazil/78, elles obtiennent un scénario 1. De plus, cette hétérogénéité est parfois observée pour un même couple, bien qu'il ait été étudié sur une durée comparable avec les mêmes mesures de compétence. Par exemple, les colonies d'*O. turicata* âgées de 5 ans infectées par une souche « inconnue » obtiennent un scénario 3 alors qu'une colonie âgée de 25 ans de cette même tique pour le même virus obtient un scénario 1. Un autre exemple est le cas du couple *O. porcinus*–MwLil/20/1 où les tiques sont trouvées naturellement infectées sur le terrain dans l'article n°21 alors que le succès d'infection n'a été possible que par une inoculation à la seringue dans les expériences de laboratoire avec une colonie de tique jeune.

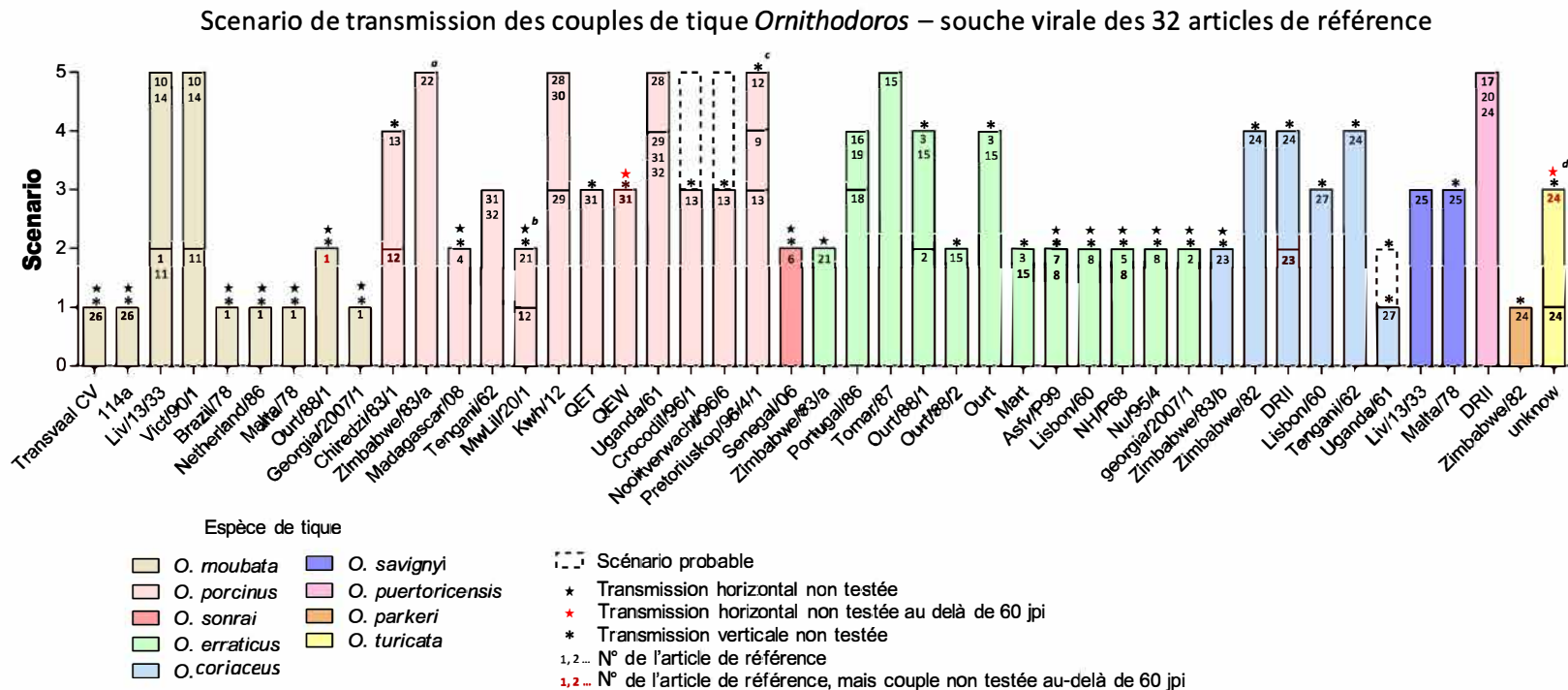


Figure 17 : Scénarios de compétence vectorielle de chaque couple de tiques *Ornithodoros* – souche de virus de la PPA étudiées dans les 32 articles de référence. Les de scénario sont présentés sur l'axe des Y et sont classés du scénario 1 correspondant à un échec d'infection des tiques au scénario 5 correspondant à un succès total de compétence vectorielle. Les espèces de tiques sont représentées dans différentes couleurs et les souches de virus de la PPA sont indiquées dans l'axe des X. a: scénario 5 obtenu après accumulation des résultats expérimentaux et de terrain pour une même couple tique-virus; b: scénario 2 obtenu pour le couple de terrain alors que l'étude expérimentale d'infection par gorgement artificiel sur membrane a donné le scénario 1, et un scénario 3 lors d'une infection par une inoculation à la seringue; c: scénario 5 par inoculation à la seringue, mais les autres résultats obtenus suppose que ce scénario serait possible suite à un gorgement infectieux; d: scénario 1 avec une colonie de tiques âgée de 25 ans et scénario 3 avec une colonie de tiques âgée de 5 ans

IV. Discussion du chapitre 1

A. Sélection des articles de références

Pour cette étude, aucun critère de qualité n'a finalement été retenu pour valider la sélection des articles de référence. Au vu des résultats obtenus, la nature de la souche de virus de la PPA et de l'espèce de tiques semble être très importante pour le succès des expériences de compétence vectorielle. Cependant, aucune recommandation n'était disponible pour choisir tel ou tel couple tiques-virus et tout type d'association nous semblait pouvoir apporter de l'information. Par exemple, l'utilisation de virus recombinants a permis de mieux comprendre les mécanismes d'entrée et de multiplication du virus même si l'utilisation de ces virus ne reflète pas les couples possibles dans la nature. En outre, nous n'avions pas plus d'avis *a priori* sur la qualité d'une technique d'étude plutôt qu'une autre ; le but de ce chapitre était entre autre de comparer ces différentes méthodologies, afin de les évaluer et d'en identifier les biais potentiels. Enfin, la taille de l'échantillon étudié est généralement considérée comme essentielle pour assurer l'obtention de résultats fiables. Pourtant, de nombreuses publications de référence présentaient peu de répliques, certainement parce que la réalisation d'infections expérimentales tiques molles-virus de la PPA s'avère laborieuse. Puisque le but de ce chapitre était plus d'extraire des données qualitatives de compétence vectorielle que de synthétiser des informations quantitatives peu représentatives du terrain, il a été décidé d'accepter tous les articles quelque soit la taille de l'échantillon traité.

Ainsi, malgré cette « large » sélection, seulement 32 articles de référence ont étudié la compétence vectorielle des tiques molles pour le virus de la PPA au cours des 50 dernières années et le groupe d'experts à chaque période était relativement restreint. Ceci reflète bien que, même si la PPA est une maladie d'importance économique et sanitaire touchant le bétail, les études sur la compétence vectorielle des tiques molles pour le virus sont laborieuses, aussi bien concernant la collecte de tiques endophiles (Jori *et al.*, 2013) que les difficultés à développer des méthodes sensibles pour détecter l'infection par le virus de la PPA dans les populations de tiques (Kleiboeker & Scoles, 2001, Plowright, 1977, Thomson *et al.*, 1983) ; en laboratoire, une longue période de 1 à 1,5 année est nécessaire pour créer une colonie de tiques stable et abondante avant l'infection, l'amplification du virus sur les macrophages alvéolaires porcins et les méthodes d'alimentation artificielle ne sont toujours pas optimales pour obtenir un titre suffisant pour infecter les tiques.

B. Définition commune de la compétence vectorielle et de ces mesures

Aucun article de référence ne déclarait travailler sur la compétence vectorielle, principalement parce que le terme « compétence vectorielle » n'est apparu que dans les années 1990. Cependant, la majorité des auteurs utilisaient une ou plusieurs mesures de compétence, permettant d'en évaluer certaines de ses étapes.

Tout d'abord, l'infection des tiques par le virus de la PPA implique l'entrée du virus dans les tiques et donc le franchissement de la barrière intestinale, elle va conditionner le reste des événements de compétence. Sans cette première étape, une tique ne peut pas devenir un vecteur compétent pour le virus de la PPA. Ce chapitre a mis en évidence la grande difficulté à évaluer cet événement, du moins au début du processus. Le problème est de pouvoir différencier les infections résiduelles qui se composent de virus ou d'ADN viral restants dans l'intestin des tiques avant leur digestion complète, d'une véritable infection par du virus vivant ayant traversé la barrière intestinale des tiques et débuté sa réplication dans les cellules de tiques. Comme proposé précédemment, une durée minimale d'étude de 60 jours entre le repas de sang infectieux et la détection/quantification du virus dans les tiques, quel que soit la méthode de détection du virus utilisée, semble être un bon compromis pour conclure à l'infection des tiques. Une autre option utilisée par certains auteurs a été de détecter une augmentation du titre viral dans les tiques après l'infection initiale, ce qui traduit une multiplication du virus dans les tiques et confirme son entrée dans les tiques.

Une des questions encore en suspens suite à l'analyse de ce chapitre concerne l'influence du nombre de repas infectieux sur le succès d'infection : La multiplication des contacts tique-virus pourrait-elle agir sur leur co-adaptation et favoriser progressivement l'infection des tiques ?

Le second événement biologique pour le virus est de se maintenir dans les tiques par le biais d'une multiplication et d'une dissémination dans tous les tissus, et ceci en dépit de la réponse immunitaire des tiques. Suite à l'analyse des courbes de tendance de la cinétique virale dans les tiques, nous avons pu voir que le virus de la PPA se propage rapidement dans l'hémolymphes des tiques, environ 20 jours pour atteindre son maximum d'infection, avant de se répandre dans les divers organes impliqués dans sa réplication secondaire, et sa transmission aux suidés ou à d'autres tiques. Cet événement biologique a rarement été évalué dans les articles de référence, les auteurs utilisant essentiellement un suivi de l'accumulation du virus et/ou de son tropisme pour les organes de tiques. Comme nous l'avons proposé, l'infection d'une tique au-delà de 182 jpi peut être considérée comme le signe de la

persistance du virus et de sa généralisation dans l'organisme des tiques. En effet, l'analyse des courbes de tendance de cinétique montre qu'il y a un maintien du titre viral sur plus de 300 jours dans 16 courbes, avec parfois une légère diminution d'environ $10^{0,5}$ HAD₅₀/tique tous les 100 jours. Ceci pourrait signifier que, même si un équilibre se crée entre la multiplication virale et sa régulation par le système immunitaire de la tique, il semble que le virus soit lentement éliminé lors de la sécrétion de liquide coxal après chaque repas de sang au cours du cycle de développement de la tique.

D'autres auteurs ont également proposé que la charge du virus de la PPA, dépendante de la charge du repas infectieux, obtenue après une première phase de multiplication dans l'intestin pouvait influencer le succès de diffusion du virus dans les organes des tiques (Ribeiro *et al.*, 2015, Plowright *et al.*, 1970b). En effet, peu de temps après l'entrée du virus dans les tiques, le virus utilise une contamination proximale de cellule en cellule puis une migration à longue distance par l'hémolymph afin de coloniser de nouveaux organes et/ou tissus. Dans le cas où l'on considère que les membranes sont des surfaces poreuses, il semble intuitivement évident que le nombre de cellules initialement infectées, et par conséquent le nombre de particules virales fondatrices, dépendent de la concentration du virus dans le repas initial de sang (Franz *et al.*, 2015, Gutiérrez *et al.*, 2012). Cependant, une autre hypothèse serait que le nombre de points d'entrée dans les divers organes de tiques soit limité en raison de systèmes de reconnaissance tique-virus et que le nombre de particules virales fondatrices resterait constant, indépendamment de la charge virale initiale ou de la circulation du virus (Gutierrez *et al.*, 2012). À part l'article de (Ribeiro *et al.*, 2015), aucune étude n'a clairement défini cette dose et les résultats des expériences de compétence vectorielle semblent très divergents. Ainsi, alors que (Ribeiro *et al.*, 2015) indiquait une infection persistante des tiques par gorgement artificiel lorsque le titre viral dans le sang infectieux était supérieur à 10^6 HAD₅₀/ml de sang, d'autres auteurs rapportaient une infection réussie à l'aide d'un titre viral compris entre 10^4 et 10^6 HAD₅₀/mL de sang. Dans la nature, un porc virémique sur lequel une tique pourrait se gorger présente rapidement une charge virale de 10^7 - 10^8 HAD₅₀/ml de sang (Howey *et al.*, 2013)). Toutefois, certaines tiques peuvent aussi s'infecter sur des phacochères juvéniles, qui présentaient une charge virale de 10^3 - 10^4 HAD₅₀/ml de sang (Heuschele & Coggins, 1969). Ces résultats mettent en évidence l'importance de mieux comprendre l'effet de la dose virale sur la compétence vectorielle, mais aussi de rechercher d'autres facteurs explicatifs tels que l'infectiosité variable du virus en fonction de son substrat, par exemple lors de culture virale mélangée à du sang de porc sain *versus* une croissance « plus naturelle » du virus dans du sang de porcs/phacochères où l'hémadsorption pourra être optimale et permettra une meilleure infection des tiques via leur digestion des globules rouges. Enfin,

aucun auteur n'a étudié l'effet de la dose virale sur le métabolisme des tiques, bien que de nombreuses tiques aient montré une mortalité plus élevée lors de stress biologiques quand elles étaient infectées par le virus de la PPA. Cela suggère l'existence possible d'un compromis évolutif entre une forte amplification du virus pour assurer une diffusion réussie dans les tiques et un maintien sous un certain seuil compatible avec la survie de la tique (Libert *et al.*, 2006).

Pour finir, le virus de la PPA doit traverser la lame basale des organes de tiques (glandes salivaires, glandes coxales, les organes reproducteurs, et les membranes d'embryons) avant d'être transmis à un autre hôte. La transmission du virus de la PPA aux suidés et/ou à d'autres tiques peut être considérée comme l'étape la plus importante d'une part pour confirmer la propagation du virus dans les tiques et d'autre part pour finaliser la compétence vectorielle.

Les tiques *Ornithodoros* étant en mesure de se gorger plusieurs fois au cours de leur cycle de développement et de vivre pendant plusieurs années au stade adulte avec plusieurs repas de sang et plusieurs copulations (Vial, 2009), les occasions de transmission vectorielle du virus augmentent d'autant plus. La transmission horizontale aux suidés est le mode de transmission épidémiologiquement essentiel quant au rôle des tiques dans la réapparition de foyers de PPA malgré la mise en place de mesures sanitaires d'éradication. Dans les articles de référence, cette transmission a été essentiellement évaluée par la mesure de signes cliniques de la maladie chez des porcs préalablement mordus par des tiques infectées. De telles expériences sont particulièrement laborieuses à mettre en place et nécessitent des installations particulières, du personnel dédié et le respect d'une charte éthique stricte. Ces difficultés peuvent expliquer pourquoi la moitié des couples tique-virus restent non testés pour la TH aux porcs. Comme indiqué dans notre examen des méthodes utilisées, la détection du virus de la PPA dans les organes ou les sécrétions potentiellement impliqués dans la transmission pourrait être un bon indicateur de la réussite de ce type de transmission. Cependant, cette utilisation reste encore à un stade expérimental que ce soit à cause des contraintes techniques pour récolter des organes ou des sécrétions de tiques, ou pour quantifier efficacement du virus dans ces organes ou sécrétions. Enfin, cette approche néglige le fait que la TH du virus n'est pleinement efficace que si elle se traduit par une virémie chez le porc, soulevant la question sur la façon dont une si petite quantité de virus de la PPA injectée par une morsure de tique est capable de générer une infection chez le porc. Très peu de publications de référence testent la charge virale nécessaire pour obtenir une transmission efficace du virus, mais certains auteurs ont montré qu'une ou deux tiques peuvent suffire à infecter un porc (Kleiboeker *et al.*, 1998, Plowright *et al.*, 1970a et 1970b). Dans (Bernard *et al.*, 2015), nous avons montré que la salive de tiques *O. porcinus* génère une immunomodulation au niveau de

la peau de porc. Une hypothèse est que cette immunomodulation pourrait favoriser le développement de l'infection locale sur le site du gorgement et la généralisation du virus, comme il a été déjà décrit pour d'autres pathogènes de tique (Pechová *et al.*, 2002).

La transmission du virus de la PPA à d'autres tiques a été rarement évaluée dans les articles de référence même si elle est cruciale dans l'épidémiologie du virus la PPA, puisqu'elle caractérise la capacité des tiques à être des réservoirs de virus de la PPA, permettant d'amplifier et d'étendre le virus au sein d'une population de tiques. Concernant la transmission sexuelle, il semble communément admis que cette transmission soit unilatérale du mâle vers la femelle et non l'inverse. Le faible taux d'infection chez les femelles saines obtenu après accouplement avec des mâles infectés suggère que la TS n'est pas une voie de transmission très efficace. Inversement, la transmission transovarienne semblerait être un moyen plus efficace pour la transmission du virus. La plupart des auteurs ont d'ailleurs judicieusement évalué la TOT grâce à la détection de virus de la PPA dans les larves ou des nymphes de premier stade et pas dans les œufs, ces derniers pouvant être contaminés à l'extérieur sans que l'embryon ne le soit. Le dernier mode de « transmission » de tique-à-tique est la transmission transtadiale qui est très efficace, mais qui ne peut cependant pas être considérée comme une véritable transmission chez les tiques. Cependant, une question demeure sur l'effet des gorgements de sang et des mues successives sur le titre viral dans les tiques. Certains articles ont rapporté une diminution du titre viral tandis que d'autres ont remarqué une augmentation après un nouveau gorgement de sang sain. Ces différences peuvent être expliquées par le temps d'étude entre le repas et le titrage du virus. Juste après le repas de sang, une partie du virus pourrait d'abord être relâché par les tiques par la sécrétion de liquide coxal pour maintenir son homéostasie (Endris *et al.*, 1991, Kleiboeker *et al.*, 1998, Kleiboeker & Scoles, 2001), puis le virus restant pourrait secondairement connaître une nouvelle phase d'amplification dans les organes suite à la digestion et l'arrivée de nouveaux métabolites (Plowright *et al.*, 1970b).

Aux vues de ces trois principales étapes de la compétence vectorielle, l'étape d'infection semble être la plus étudiée tandis que les étapes de transmission sont les moins étudiées. Ceci semble principalement dû à des contraintes techniques qui aboutissent à une évaluation partielle de la compétence vectorielle pour les trois-quarts des couples tique-virus et rendent difficile la comparaison de ces couples.

C. Diversité des patrons de compétence vectorielle et identification des facteurs clés.

Malgré une évaluation partielle de la compétence vectorielle pour de nombreux couples tique-virus, une note de scénario de compétence a pu être attribuée pour chaque couple. L'observation de ces notes suggère qu'au final toutes les espèces de tique *Ornithodoros* d'Afrique, d'Europe et d'Amérique du Nord (sauf *O. sonrai* et *O. parkeri* pour qui trop peu de données sont disponibles) pourraient être des vecteurs compétents pour le virus de la PPA. Toutefois, le résultat de ces scénarios soulève une question sur l'importance du temps de transmission du virus. Selon les critères de la compétence vectorielle, si une tique transmet une fois le virus, elle est considérée comme compétente, cependant elle n'aura pas le même impact qu'une tique pouvant transmettre le virus tout au long de sa vie. Ceci démontre l'importance de fixer ce seuil de temps minimal en fonction de critère spécifique. La biologie d'une tique en laboratoire montre que 60 dpi est un seuil raisonnable, toutefois, dans la nature est-ce qu'une tique peut réellement réaliser des repas aussi fréquemment ? De là vient aussi la nécessité d'évaluer la compétence sur un temps beaucoup plus long, choisis à 182 Jpi. L'élaboration du scénario n°5 soulève une autre question sur ce que représente le rôle de réservoir de la tique dans sa compétence vectorielle. On peut effectivement se demander si dans la nature, lorsque la transmission à un hôte vertébré n'est pas réalisable assez rapidement pour que le virus puisse poursuivre son cycle épidémiologique, est-ce que ces autres voies de transmission tique à tique ne rendent pas la tique plus compétente ? En effet, comme il a déjà été proposé dans le dernier avis d'experts de l'EFSA sur la PPA (EFSA, 2014), les dispositions d'*O. erraticus* à transmettre d'autres souches du virus de la PPA et d'être pleinement compétente semble moins évidente que pour les vecteurs africains avérés *O. porcinus* et *O. moubata*. Notre analyse a montré que la TS n'a été signalée que deux fois pour *O. erraticus*, avec les souches Tomar/87 et Portugal/86, à un taux de transmission très faible. En outre, la TOT a toujours échoué pour *O. erraticus* en utilisant les souches Zimbabwe/83/a et Portugal/86. Inversement, les espèces *O. moubata* et *O. porcinus* qui ont été testées respectivement deux et trois fois pour la TOT (y compris avec la souche Zimbabwe/83/a) ont toujours réussi à transmettre le virus à la descendance bien que les taux de transmission pouvaient varier. En dehors de l'hypothèse qu'*O. erraticus* pourrait être un vecteur un peu moins compétent pour le virus de la PPA que les tiques africaines historiques, ces résultats pourraient simplement refléter un biais d'échantillonnage dû au faible nombre de couples *O. erraticus*-virus de la PPA testés pour les différents modes de transmission de tique à tique ou aux caractéristiques spécifiques des deux souches de virus testées. Cela peut aussi refléter un temps de co-évolution plus court entre le virus de la PPA et *O. erraticus* puisque le virus de la

PPA a été introduit dans la péninsule ibérique dans les années 1960 et que toutes les souches ibériques sont très similaires (Bastos *et al.*, 2003). Une co-évolution plus longue et plus étroite entre les deux pourrait aboutir à un système plus adapté et à une meilleure transmission de tique à tique. Cependant, l'espèce *O. puertoricensis*, qui a seulement été testée avec la souche DR11 et qui n'a jamais eu de contact préalable avec le virus de la PPA, s'est révélée pleinement compétente.

De la même manière que pour n'importe quel couple vecteur-parasite, l'adaptation entre les tiques *Ornithodoros* et le virus de la PPA peut être soutenue par des bases génétiques, soit chez les tiques soit chez le virus. Par exemple, les gènes des familles multigéniques 530-360 du virus de la PPA sont nécessaires pour la réplication virale et la généralisation de l'infection chez les tiques (Burrage *et al.*, 2004). Il a également été démontré que la restauration du gène EP153R chez le virus, qui est impliqué dans le codage de protéines du CD2v requis pour le pouvoir hémadsorbant du virus, augmente la réplication du virus dans les tiques (Rowlands *et al.*, 2009). Des preuves de l'existence de déterminants génétiques de susceptibilité au virus de la PPA chez les tiques molles sont moins évidentes. Cependant, comme pour d'autres arthropodes, les tiques molles peuvent avoir un système immunitaire (sous dépendance génétique) qui pourrait être exprimé à des niveaux cellulaires et humoraux contre les organismes étrangers, y compris contre le virus de la PPA, par phagocytose, encapsulation, production de peptides antimicrobiens et de molécules effectrices comme la lectine ou le lysozyme (Diaz-Martin *et al.*, 2013, Hajdusek *et al.*, 2013, Kopáček *et al.*, 1999). Cette réaction est suggérée dans notre analyse par l'observation de surmortalité chez les tiques infectées, en particulier lorsque des contraintes physiologiques comme la ponte sont ajoutées au coût de l'infection (Endris & Hess, 1994, Kleiboeker & Scoles, 2001). Une autre preuve peut être la différence de susceptibilité des tiques (entre espèces ou au sein d'une même espèce) à être infectées par le virus de la PPA (Hajdusek *et al.*, 2013, Higgs *et al.*, 2004). Le principal défi pour le virus est de traverser les barrières tissulaires naturelles des tiques (par exemple la lame basale des différents organes), et/ou d'infecter des cellules de tiques, et ces événements reposent sur des mécanismes de reconnaissance tique-virus. Enfin, certains gènes de tiques codent également pour les composants de la salive des tiques qui peuvent moduler la réponse immunitaire locale lors de la morsure du porc et par conséquent jouer un rôle important en créant un environnement local plus propice à la transmission du virus (Bernard *et al.*, 2015, Francischetti *et al.*, 2009, Nuttall & Labuda, 2004, Nuttall, 2009).

Outre les facteurs intrinsèques qui influent sur la compétence vectorielle des tiques pour le virus de la PPA, l'environnement du couple tique-virus peut être également être important.

Parmi notre sélection d'articles, aucune étude n'enquête sur ces déterminants. Les auteurs ne signalent pas systématiquement la température utilisée pour maintenir les tiques infectées, ce facteur ne pouvant donc être évalué dans ce cas. Cependant, dans d'autres modèles comme chez les moustiques, il a été démontré que la période d'incubation extrinsèque, qui est le temps nécessaire de l'acquisition du virus par le vecteur jusqu'à sa transmission, peut être influencée par la température extérieure (Weaver, 2004). En effet, l'accumulation de virus dans son vecteur est directement sous l'influence de la température extérieure, car les arthropodes sont des organismes hétérothermes. En outre, la température peut augmenter le métabolisme des arthropodes et influencer indirectement la multiplication du virus. Un autre paramètre extrinsèque peut être le microbiome des tiques. Plusieurs modèles ont montré l'influence du microbiome dans la compétence vectorielle et notamment lors de l'étape d'infection (Hegde *et al.*, 2015, Jupatanakul *et al.*, 2014, Dale & Welburn, 2001). Par exemple, la présence ou l'absence de bactéries du tube digestif est connue pour modifier la compétence vectorielle des glossines à *Trypanosoma* (Dale & Welburn, 2001) et l'absence de certains endosymbiontes est connue pour améliorer l'immunité face à une infection virale chez les moustiques (Hardy *et al.*, 1983, Weiss & Aksoy, 2011). L'existence d'endosymbiontes a été confirmée chez les tiques *Ornithodoros* mais leur influence sur les traits d'histoire de vie des tiques ou sur leur compétence vectorielle n'a jamais été évaluée (Alberdi *et al.*, 2012, Almeida *et al.*, 2012, Noda *et al.*, 1997). Cependant, dans notre analyse des courbes de tendance, il est manifeste que les titres les plus élevés de virus dans les tiques ont été obtenus suite à l'utilisation d'antibiotiques au cours d'un repas de sang infectieux (dans l'article n°2, seul article à mentionner clairement leur utilisation). On peut donc se demander si les antibiotiques peuvent avoir un impact sur le microbiome des tiques ou une influence sur la fragilité de l'intestin et favoriser le phénomène de « leaky gut » lors de la première phase de digestion du repas de sang et mener ainsi le virus directement dans l'hémocèle des tiques (Rennie, 1998, Ribeiro *et al.*, 2015).

Ainsi, face aux scénarios obtenus dans cette analyse, l'hypothèse principale d'une adaptation intrinsèque entre tiques et virus ne semble pas suffisante pour expliquer l'hétérogénéité observée et suggère que d'autres facteurs peuvent influencer le succès de la compétence des couples tique-virus. La plupart des études qui ont testées la compétence vectorielle des tiques molles pour le virus de la PPA ont été menées en laboratoire et la grande diversité des méthodologies utilisées pour recréer un phénomène naturel pourrait grandement influencer les résultats obtenus.

D. Diversité et limite des méthodologies évaluant la compétence vectorielle

Les méthodologies utilisées pour étudier la compétence vectorielle sont très diverses parmi les 32 articles de référence. L'analyse de ces méthodes peut toutefois permettre d'identifier certains facteurs techniques importants qui influenceraient le succès de la compétence vectorielle, en plus des facteurs impliqués dans l'adaptation des couples tique-virus.

Tout d'abord le choix des souches de virus de la PPA et de l'espèce de tique testées expérimentalement devraient si possible refléter au maximum les couples tique-virus que l'on rencontre dans la nature. Ainsi, le maintien en laboratoire des tiques, ou des souches virales, peut affecter le succès de la compétence vectorielle. Pour les colonies de tiques, différents âges ont été signalés dans les articles de référence allant de colonies échantillonnées sur le terrain à des colonies âgées de 25 ans. L'élevage sur une longue période en laboratoire, sans introduction régulière de nouveaux individus de terrain, peut entraîner une forte consanguinité, de la dérive génétique et de la sélection artificielle, qui ont tendance à homogénéiser les populations de tiques, en particulier lorsque le nombre d'individus fondateurs est faible (Jones & Foster, 1978, Weaver, 2004). En conséquence, pour une même espèce de tiques, une ancienne colonie de tiques peut ne plus refléter la compétence vectorielle d'une population naturelle de tiques, parce que les déterminants génétiques impliqués dans la compétence vectorielle peuvent avoir été perdus ou modifiés (Gooding, 1996). Le meilleur exemple est le cas d'*O. turicata*, qui ne transmet plus un même virus de la PPA selon que la colonie de tiques soit âgée de 25 ans ou de 5 ans. Cette hypothèse devrait cependant être modulée puisque cette différence n'a pas été systématiquement observée chez d'autres couples de tique-virus. En outre, les tiques molles sont considérées comme naturellement très sédentaires, d'où une forte structuration naturelle de leurs populations et un faible flux génétique entre populations qui seraient alors naturellement consanguines (Vial, 2009). Le temps de maintien au laboratoire peut également influencer sur la qualité du virus, suite à sa réplication sur des cultures de macrophages alvéolaires porcins. Cependant, très peu d'articles de référence ont indiqué le nombre de passages du virus de la PPA sur culture cellulaire et lorsque celui-ci a été mentionné, il était impossible de savoir si l'échantillon viral utilisé pour l'expérience était issu de celui initialement isolé ou non. Ainsi, ce paramètre n'a pas été évalué dans l'analyse, et devrait être davantage étudié.

Concernant la méthodologie d'infection des tiques avec le virus de la PPA, il semble que le repas sanguin des tiques sur porcs infectés soit la meilleure option par rapport aux méthodes artificielles. Voilà pourquoi la moitié des articles de référence étudie la compétence vectorielle grâce à des expériences de laboratoire en utilisant cette technique bien qu'elle soit décrite comme laborieuse et moins éthique. Les méthodes de gorgement artificiel, y compris par capillaires ou par membranes artificielles en silicone ou en parafilm®, présentent l'avantage de pouvoir contrôler strictement la dose de virus infectieux ingéré par les tiques et d'être facilement reproductibles. Cependant, la membrane peut être moins attrayante pour les tiques, et des stimulants de fixation tels que des poils d'animaux ou tout autre produit libérant des odeurs animales doivent être déposés sur la membrane (Allan, 2010, Krober & Guerin, 2007b). Des phagostimulants, tels que l'ATP ou le saccharose ajoutés au sang de gorgement, ont été peu testés chez les tiques molles, mais ils ont prouvé leur efficacité en favorisant le gorgement chez d'autres arthropodes hématophages (Galun & Kindler, 1968, Ben-Yaki & Galun, 1993, Lehane, 2005). Si l'hypothèse de l'effet de la dose virale sur le succès d'infection est confirmée dans le modèle de la PPA, la limite principale de ces méthodes artificielles semble être la difficulté d'obtenir un haut titre viral similaire à ceux observables chez les porcs virémiques, en utilisant une amplification par culture cellulaire sur macrophages alvéolaires porcins. En effet, il est difficile d'obtenir un titre supérieur à 10^7 HAD₅₀/ml de culture, même avec des techniques de concentration par ultracentrifugation. De plus, la culture virale doit être diluée dans du sang de porc pour infecter les tiques par gorgement, ce qui diminue le titre viral d'encore 10 ou 100 fois dans le repas sanguin. Par ailleurs, la culture cellulaire du virus de la PPA est aussi confrontée à un problème d'éthique car elle nécessite l'utilisation de poumons de porcelet âgé de 6 à 8 semaines, avec un rendement assez faible nécessitant l'utilisation de plusieurs porcelets pour obtenir plusieurs mL de culture virale à haut titre. Actuellement aucune lignée cellulaire ne permet de se substituer aussi efficacement à l'utilisation de macrophages alvéolaires porcins.

Cependant, pour pallier au gorgement sur porc, de nombreux appareils utilisant des membranes artificielles ont été décrits par les auteurs et peuvent introduire une variabilité dans les résultats de la compétence vectorielle. Ils sont néanmoins tous basés sur les mêmes principes : une chambre contenant les tiques est placée au-dessus d'une poche de sang chauffé pour imiter la physiologie naturelle de tiques molles lors du gorgement (Allan, 2013) ; une membrane, mordue par les tiques, va imiter la peau de l'hôte ; un mélange de sang défibriné ou hépariné, avec du virus, est utilisé pour éviter la coagulation du sang et parce que l'héparine est naturellement sécrétée par les tiques pendant le repas de sang et ne semble pas influencer la physiologie des tiques (Francischetti *et al.*, 2009) ; et un système de circulation ou d'agitation du sang peut être ajouté pour éviter la sédimentation des globules

rouges qui peut entraîner un biais lors de l'ingestion d'une dose souhaitée de virus de la PPA par les tiques (Wade, 1976). Le dernier système d'infection possible est l'inoculation à la seringue, qui a également été utilisé dans quelques articles. Il peut être considéré comme la meilleure méthode pour assurer l'infection de tiques, puisqu'il permet de s'affranchir du passage de la première barrière intestinale (Kleiboeker *et al.*, 1999). Cependant, cette technique est très invasive et très loin des conditions naturelles d'infection des tiques (Ribeiro *et al.*, 2015). Elle devrait être utilisée uniquement pour tester des mécanismes spécifiques de la diffusion du virus dans les tiques, voir dans certain cas de la transmission.

Ensuite, pour surveiller l'infection des tiques, ont été utilisées dans les articles de référence diverses méthodes qui ne mesurent ni les mêmes choses ni ne présentent la même sensibilité / spécificité. L'isolement viral (et par extension le titrage viral basé sur le même principe) est la technique la plus utilisée pour confirmer l'existence de virus vivant et répliatif dans les tiques. Toutefois, il semble que des composants au sein des tiques peuvent avoir un effet cytotoxique sur les macrophages de porc et inhiber l'isolement (Oura *et al.*, 2013). L'inconvénient de cette méthode est aussi son temps de réalisation. C'est une méthode longue, car il faut au moins 6 jours pour conclure sur la présence du virus, et parfois jusqu'à 3 passages suivant les recommandations de l'OIE (OIE, 2012). D'autres techniques ont également été élaborées par quelques auteurs pour détecter la présence de virus vivant : la RT-PCR, l'immunofluorescence directe, ou l'histologie et l'immunoblot. Les deux dernières méthodes sont basées sur des réactions antigéniques avec des besoins d'anticorps très spécifiques et des mises au point importantes afin d'éviter une réaction croisée et aspécifique (Mighell *et al.*, 1998). Parallèlement, des méthodes de biologie moléculaire (par exemple par PCR classique, PCR nichée et PCR en temps réel) ont également été utilisées par quelques auteurs. Ces techniques sont actuellement les méthodes les plus rapides et les moins coûteuses puisqu'un échantillon de tique peut être traité en une journée. La méthode de PCR quantitative en temps réel est considérée comme la plus prometteuse, car c'est une méthode quantitative utile pour la surveillance de l'accumulation virale dans les tiques et qui est plus rapide que le titrage. Cependant, la détection de l'ADN par cette méthode ne signifie pas que du virus infectant est présent. Ainsi, des mises au point de cette méthode sont encore nécessaires pour éviter la surestimation du titre de virus dans chaque tique et valider le taux d'infection chez les tiques. La méthode de RT-PCR quantitative en temps réel serait probablement l'outil idéal en alliant la quantification à la vérification de la présence de virus vivant, mais reste tout aussi difficile à mettre au point, voir plus difficile à cause de la plus grande fragilité des ARN. La principale difficulté rencontrée dans les techniques de biologie moléculaire est la présence des composés polyphénoliques des tiques, qui sont connus pour

inhiber les réactions d'amplification par PCR, ce qui peut entraîner des résultats faussement négatifs ou non reproductibles (Halos *et al.*, 2004). Toutes ces techniques, si elles sont appliquées aux différents organes de tique suite à une dissection, peuvent aider à évaluer la diffusion du virus de la PPA dans les tiques et à prévoir une transmission réussie, comme cela a été appliqué dans plusieurs articles. Toutes ces techniques de détection d'ADN peuvent être utilisées soit individuellement, soit en poolant les tiques, afin d'obtenir des résultats rapides et qualitatifs de compétence vectorielle. Toutefois, toutes les techniques sont basées sur la destruction de l'échantillon de tiques, ce qui peut conduire à des biais dans la surveillance de l'accumulation virale dans les tiques à cause des variations inter-individuelles. Une autre option pourrait être de détecter et de quantifier le virus dans les sécrétions de tiques comme la salive ou du liquide coxal, comme cela a été effectué pour quelques rares articles. L'inconvénient est la fréquence de suivi qui est limitée à 1 - 1,5 mois, ce qui est le délai minimal entre deux repas de sang et des événements de sécrétion (Vial, 2009). De plus, la sensibilité de la détection pourrait être inférieure en raison de la petite quantité de matière récoltée.

V. Conclusions et perspectives du chapitre 1.

La compétence vectorielle est l'aptitude pour un vecteur à s'infecter, à maintenir son parasite et à le transmettre. Bien que cette définition soit centrée sur le vecteur, la compétence vectorielle est en fait une notion bien plus complexe qui résulte d'interactions étroites entre le vecteur, le parasite et leur environnement, aboutissant à un équilibre vecteur-parasite pouvant se modifier à tout moment sous l'effet de l'environnement. Cet équilibre entre un vecteur et son parasite est le fruit d'adaptations conjointes et intimes. Ce chapitre a en effet montré que chaque étape de la compétence vectorielle est constituée de plusieurs événements biologiques successifs. Dans notre modèle tique *Ornithodoros* et virus de la PPA, cette définition de la compétence vectorielle est intuitivement acceptée par presque tous les auteurs, ces derniers utilisant d'ailleurs des mesures de compétence relativement communes. Cependant, l'évaluation de la compétence vectorielle est souvent partielle, et les méthodes utilisées pour évaluer cette compétence restent très diverses. Si les auteurs n'abordent pas forcément toutes les étapes de la compétence, en particulier concernant les événements de transmission, cela est principalement dû aux nombreuses contraintes techniques et éthiques évidentes liées à l'expérimentation sur porc et à l'élevage des tiques. Cependant, la transmission du virus peut être considérée comme le plus important événement de la compétence vectorielle, car il fournit la conclusion finale sur la faculté des tiques à être des vecteurs. L'impact de cette étape est aussi très important. La transmission

aux porcs contribue probablement à la ré-émergence de la maladie par des morsures des tiques dans d'anciens foyers de PPA et à la mise en place de mesures de contrôle spécifiques. La transmission du virus au sein des populations de tiques quant à elle joue un rôle dans la persistance à long terme du virus. Cependant, les événements d'infection des tiques sont une condition préalable, et peuvent être vus comme une prévision de réussite pour la transmission. L'étude des articles de référence a démontré la difficulté de recréer ces événements d'infection en laboratoire en utilisant des méthodes artificielles et suggèrent que la diversité des méthodes utilisées peut expliquer une partie des écarts de résultats dans les scénarios de la compétence vectorielle. Une méthode consensuelle et optimisée pour infecter artificiellement les tiques avec le virus de la PPA devrait être élaborée. En outre, les techniques de quantification du virus dans les tiques devraient aussi être améliorées.

Au final, cette diversité d'approche ne permet pas de déterminer correctement et complètement les scénarios de compétence pour chaque couple tique-virus et rend difficile la comparaison des études entre elles.

En ce qui concerne les lacunes dans les connaissances actuelles sur les différents couples tique-virus et la diversité des méthodologies qui peuvent fausser les résultats de la compétence vectorielle, il semble optimiste d'extrapoler un résultat de compétence vectorielle générale pour toutes les espèces de tiques et pour toutes les souches de virus de la PPA, en se basant uniquement sur la littérature publiée, même si cela semble attrayant. En effet, si la notion de compétence vectorielle a une réponse binaire oui/non pour 1 réplique et un couple, l'étude de la compétence dans son ensemble et surtout la réponse à la question la plus importante : « est-ce que la population de tiques, voire une espèce de tiques est compétente pour une souche virale ? » est bien plus subtile que cette réponse oui/non, parce qu'elle fait appel au résultat d'une interaction complexe entre le vecteur, le virus et leur environnement. Cette extrapolation donnerait alors une valeur réduite de la compétence vectorielle à l'aptitude d'une tique d'être infectée et de transmettre le virus de la PPA. De fait, peu d'auteurs se sont aventurés dans la caractérisation générale de cette compétence.

En ce qui concerne les facteurs influençant ces étapes, le plus évident est celui soutenu par des bases génétiques dues aux tiques et au virus. Certains marqueurs génétiques sont proposés pour augmenter la faculté du virus à pénétrer et se multiplier dans les cellules de tiques alors qu'on ne sait rien sur les déterminants génétiques qui influencent la compétence des tiques molles à accumuler et à transmettre le virus de la PPA. Cependant, quelques preuves (par exemple de l'effet pathogène du virus de la PPA sur les tiques, la variabilité de la capacité des tiques à s'infecter, le rôle de la salive comme catalyseur de la transmission du

virus de la PPA ...) ont été fournies dans ce chapitre pour proposer des pistes concernant les déterminants génétiques de la tique à sa susceptibilité aux différentes souches du virus de la PPA. Bien qu'il n'ait jamais été testé, l'effet de l'environnement, tel que la température externe ou le microbiome des tiques, peut également influencer sur l'adaptation tique-virus, en particulier sur la période d'incubation extrinsèque du virus ou sur le succès d'infection, et devrait être davantage étudié.

Au final, face à tous ces facteurs « naturels » et « méthodologiques » qui peuvent influencer les expériences de compétence vectorielle, une meilleure connaissance de la compétence vectorielle des tiques *Ornithodoros* pour le virus de la PPA nous permettrait de proposer quelques recommandations pour tester rapidement et de façon fiable la compétence vectorielle. En premier lieu, il est important d'envisager les expériences d'infection et de transmission bien en amont pour avoir la possibilité de produire une quantité de tiques suffisante. L'autre possibilité est d'utiliser des tiques de terrain et ainsi d'éviter les sélections artificielles qui pourraient faire perdre aux tiques leur compétence. Cependant, pour favoriser leur gorgement le jour de l'infection, il est préférable de les mettre à jeun quelques mois avant. Une population de plus d'une centaine d'individus de dernier stade nymphal ou d'adultes permettrait d'être suffisamment représentatif et de palier aux possibles pertes durant l'expérience (non gorgement lors de l'infection, mortalité durant les expériences, non gorgement lors des essais de transmission). Ensuite, le mode idéal d'infection des tiques resterait le gorgement sur porcs virémiques ou au moins sur sang de porc virémique, permettant d'obtenir un haut titre viral et des interactions plus naturelles entre le virus et le sang de porc. Le temps de suivi optimal des tiques serait d'au moins 6 mois avec un test de transmission horizontale sur porc après 2 mois, complété si possible avec un nouveau test après 6 mois. Enfin, pour affiner les résultats de compétence, il serait intéressant après le second essai de transmission de continuer l'étude en conservant les tiques pour tester la transmission de tique à tique, chez les descendants de tiques infectées (sur 2 à 4 cycles gonotrophiques) et chez les femelles mises en accouplement avec des mâles infectés.

Chapitre 2 : Évaluation de la compétence vectorielle de trois espèces de tiques

***Ornithodoros* pour deux souches du virus de la PPA de génotype II.**

I. Introduction

La synthèse bibliographique réalisée nous a permis d'identifier que le choix du couple tique-virus est un des facteurs intrinsèques internes permettant le succès de la compétence vectorielle des tiques *Ornithodoros* pour le virus de la PPA. Ce chapitre sera donc consacré à évaluer ce facteur au travers d'une étude expérimentale d'infection de trois espèces de tiques *Ornithodoros* par deux souches de virus, puis par des essais de transmission du virus par des tiques infectées au porc, selon les mêmes modalités d'association.

Les souches de virus choisies pour cette étude sont la souche géorgienne, Georgia/2007/1, et la souche malgache Ambaton/02. Le choix de ces souches s'est imposé en raison de la progression de la PPA en Europe de l'Est et de la récurrence des épidémies depuis que la maladie a été introduite en Géorgie en 2007. Par analyse phylogénétique, il s'avère que la souche Georgia/2007/1 appartient au génotype II et est très proche des souches de virus malgaches (Rowlands *et al.*, 2008). Les souches de virus appartenant au génotype II sont présentes en Afrique de l'Est depuis 1991 et se retrouvent distribuées entre la Tanzanie, le Mozambique, le Zimbabwe et l'île de Madagascar (Lubisi *et al.*, 2005, Uttenthal *et al.*, 2013). La première épizootie de PPA à Madagascar recensée en 1998 était probablement due à une introduction du virus en provenance du Mozambique (Rowlands *et al.*, 2008).

Les souches de génotype II font partie des souches de virus les plus virulentes et contagieuses, elles provoquent une forme clinique subaiguë à aigue de la maladie et un taux de mortalité proche des 100 % (Bernard *et al.*, 2015, Gallardo *et al.*, 2015, Guinat *et al.*, 2014). Les signes cliniques les plus fréquents sont une hyperthermie supérieure à 41 °C, un comportement diminué sans réponse aux stimuli externes voir une prostration, une cyanose de la peau pouvant aller jusqu'à la nécrose, des diarrhées hémorragiques ainsi que des dyspnées importantes. Au plan lésionnel, des pétéchies sont presque toujours observées lorsque l'organe n'est pas hémorragique (vessie, rein), les poumons peuvent être collapsés et inflammés et la rate est noire et friable (Galindo-Cardiel *et al.*, 2013).

Les souches de virus actuellement séquencées du génotype II ont été isolées d'échantillons d'organes de porcs ou de phacochères (Michaud, 2013). Cependant, sans avoir été séquencé, du génome viral de PPA a aussi été détecté dans des tiques de l'espèce *Ornithodoros porcinus* prélevées à Madagascar (Ravaomanana *et al.*, 2010) où seules des souches de génotype II ont été retrouvées. Ces tiques pourraient aussi être impliquées dans le

cycle de transmission du virus au porc domestique (Ravaomanana *et al.*, 2010), ce qui laisse présumer de leur compétence à transmettre les souches virales malgaches.

En Europe de l'est, l'accélération de la dispersion de la PPA depuis 2 ans, avec un dernier foyer recensé en Ukraine le 10 octobre 2015 chez les porcs et le 12 octobre 2015 chez les sangliers (<http://www.oie.fr>), soulève des questions sur le rôle joué par les sangliers et les tiques vis-à-vis des souches virales de génotype II dans les cycles de transmission du virus. Les modèles épidémiologiques montrent que les facteurs de risque sont aujourd'hui seulement liés aux traitements des déchets contaminés, aux transports d'animaux dans l'industrie du porc et aux déplacements libres des sangliers (Mur *et al.*, 2014). Les tiques *Ornithodoros* ne représenteraient pour le moment qu'un risque nul à mineur dans le maintien et la résurgence de foyers de PPA. Cela semble se confirmer puisqu'en dehors de l'espèce *O. erraticus* distribuée dans la péninsule ibérique, seule l'espèce *O. asperus* (anciennement nommée *Ornithodoros verrucosus* (Guglielmone *et al.*, 2010)) a été décrite aux frontières de l'Europe, dans une zone assez restreinte du Caucase et de la Russie (Vial, 2009). Peu de données sont disponibles sur cette espèce et elle n'a jamais fait l'objet de recherches dans le cadre de la PPA. Un programme d'échantillonnage préliminaire de ces tiques, soutenu par le projet Européen « Targeted research effort on African swine fever » (ASFORCE) (Funded by the European Union's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under Grant Agreement n°311931), révèle que cette espèce si elle existe encore dans ces régions d'Europe de l'Est et du Caucase reste rare et distribuée de manière hétérogène (Vial, communication personnelle).

Cependant, il est important de connaître quel risque représenterait l'introduction de la souche géorgienne dans la péninsule ibérique, où les tiques *O. erraticus* sont encore implantées. En effet, plusieurs études ont montré que les tiques de l'espèce *O. erraticus*, présentes en Espagne et au Portugal, étaient capables de transmettre à des porcs des souches virales de génotype I lors de précédents foyers en Europe dans les années 1970 à 1980 (Ribeiro *et al.*, 2015, Boinas, 1994, Endris & Hess, 1994). De plus, une étude a montré que la souche de virus Georgia/2007/1 est capable de se multiplier et de se maintenir à un fort titre viral pendant 12 semaines dans ces tiques (Diaz-Martin *et al.*, 2011). Nous avons donc choisi d'étudier cette espèce, ainsi que les espèces africaines *O. moubata* et *O. porcinus*. L'espèce *O. moubata* est historiquement connue en Afrique pour être un vecteur compétent de plusieurs souches virales de PPA (Kleiboeker & Scoles, 2001). Quant à l'espèce *O. porcinus*, certaines études ont aussi montré sa capacité à transmettre certaines souches de virus, et de l'ADN de virus de la PPA a déjà été retrouvé dans des tiques *O. porcinus* malgaches. De plus, elles sont

soupçonnées d'être à l'origine de la récurrence des épidémies se produisant dans certains villages malgaches (Ravaomanana *et al.*, 2011).

L'objectif de ce chapitre est donc de comparer expérimentalement l'aptitude de ces trois espèces d'*Ornithodoros* à s'infecter par deux souches de virus de génotype II et à les retransmettre au porc, selon pour chaque couple deux modalités expérimentales : infection artificielle par gorgement sur membrane avec un titre viral dans le sang de gorgement inférieur à 10^5 HAD₅₀/ml (dilution d'une culture virale dans du sang de porc), ou infection naturelle par gorgement sur des porcs présentant une virémie supérieure à 10^7 HAD₅₀/ml.

II. Matériel et Méthodes

A. Matériel biologique

1. Souches virales

Les deux souches de virus sont des souches de génotype II, hémadsorbantes, qui ont été isolées à partir de rates de porc domestique. La souche malgache est l'isolat Ambaton/02. Elle a été collectée et gracieusement fournie en 2002 par la Direction de la santé animale et du phytosanitaire de Madagascar, puis isolée au Cirad. La souche d'origine géorgienne est l'isolat Georgia/2007/1. Elle a été collectée en 2007, isolée pour la première fois à l'Institute for Animal Health, du laboratoire de Pirbright, United Kingdom, et gracieusement fournie à l'Anses. Les deux souches ont été séquencées sur une partie du gène B646L codant la VP72 et présentent 100 % d'homologie sur cette séquence (n° accession AM999764 pour Georgia/2007/1 et n° accession KP144287 pour Ambaton/02). La souche Georgia/2007/1 a aussi été séquencée complètement (n° accession FR682468).

La production du stock viral est réalisée sur macrophages alvéolaires de porcs exempts d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS). La récolte des macrophages est réalisée suivant le mode opératoire de l'Anses adapté d'après (Wensvoort *et al.*, 1991, van Leengoed & Kamp, 1989). En moyenne, il est possible de récolter 800 millions à 1,5 milliard de macrophages par lavage broncho-alvéolaire des poumons d'un porcelet de 6 à 9 semaines.

Le protocole de titrage du stock viral suit les recommandations du manuel OIE (OIE, 2012). Les macrophages alvéolaires porcins sont ensemencés dans des plaques de culture cellulaire 96 puits (P96) à raison de 260000 macrophages par puits dans 150 µl du milieu de culture

(MEM avec sels de Earl et de l'HEPES (Eurobio), du sérum de fœtus de bovin à 10 %, de la pénicilline (20 U/ml), de la streptomycine (20 µg/ml), de l'amphotéricine B (0,5 µg/ml)). Dans chaque puits est ajouté 50 µl d'un mélange de milieu MEM et d'homogénat clarifié à titrer (stock viral, sang, organes, ou tiques), à raison de 8 dilutions de 10^{-1} à 10^{-8} et de quatre puits par dilution. Pour permettre la sédimentation et l'adhésion des macrophages dans les puits, ils sont incubés 1 h à 37 °C et 5 % de CO₂, avant ajout de sang complet hépariné de porc (10 µl de sang complet/puits dilué à 2,5 %). La plaque est ensuite placée à 37 °C et 5 % de CO₂. Chaque puits est ensuite observé quotidiennement pendant 7 jours pour détecter le phénomène d'hémadsorption, signe de la réplication virale. Ce phénomène consiste en la formation de rosettes suite à l'adhésion des globules rouges à la membrane plasmique des macrophages infectés.

Le calcul du titre s'effectue suivant la formule de Kärber (Kärber, 1931) :

$$T = d + (r/N * (n+N/2))$$

d= log négatif de la dernière dilution donnant une réponse 100 % positive

r = log de la raison R (R=intervalle de dilution)

N= nombre de puits par dilution

n= nombre de puits donnant une réponse positive

L'unité est exprimée en dose entraînant 50 % d'effet par unité de volume. (DE₅₀/volume)

Exemple avec une réponse de plaques telle que

Dilution	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
Puits n°1	+	+	+	-	-
Puits n°2	+	+	-	-	-
Puits n°3	+	+	+	-	-
Puits n°4	+	+	+	+	-
Puits n°5	+	+	-	-	-

Le calcul est $T = 4 + (1/5 * (4+5/2)) = 5,3$ DE₅₀/volume testé

2. Tiques *Ornithodoros spp*

O. moubata est une tique originaire d'Afrique australe. La population maintenue au laboratoire du Cirad a été gracieusement fournie par le laboratoire de parasitologie de la faculté des sciences de l'Université de Neuchâtel en 2008. Son origine exacte a été perdue, mais il est presque certain que cette population ait été récoltée il y a plus de 40 ans. Au Cirad, la colonie a été maintenue par des gorgements sur du sang de vache hépariné. Cependant, les gorgements à Neuchâtel étaient réalisés sur sang défibriné avec ajout d'antibiotiques.

O. porcinus a été échantillonnée entre 2006 et 2010 dans une ferme du village de Mahitsy sur l'île de Madagascar. La ferme était connue pour avoir présenté des épisodes récurrents de PPA depuis 2000, dont l'origine était supposée due à la présence de tiques infectées (Ravaomanana *et al.*, 2010). Pour éviter de nouvelles contaminations, aucun porc n'y avait été introduit depuis 2004. Pour créer au Cirad de Montpellier un élevage de tiques saines, des accouplements ont été réalisés au FOFIFA - DRZV (Département de Recherches Zootechniques et Vétérinaires) par Frédéric Stachurski (chercheur au Cirad). Les pontes provenant de ces couples ont été conservées et maintenues en élevage séparément des adultes. Les adultes ont ensuite été envoyés au Cirad, conservés en alcool, pour contrôler leur statut infectieux. Cela a été réalisé par la détection de l'ADN du virus de la PPA à partir d'un broyat de tique entière (extraction d'ADN par un protocole de phénol–chloroforme, puis détection d'ADN par un protocole de PCR nichée (Basto *et al.*, 2006, Ravaomanana *et al.*, 2011)). Les descendants des couples non infectés ont ensuite été envoyés au Cirad au printemps 2012 pour débiter l'élevage. Les autres descendants des couples infectés ont été détruits à Madagascar.

O. erraticus a été récoltée par Fernando Boinas, chercheur au Centre for Interdisciplinary Research in Animal Health (CIISA) au Portugal, et envoyée au Cirad en automne 2013. Les tiques proviennent de populations considérées comme indemnes de virus de PPA dans la région d'Alentejo au Portugal, parce qu'aucun foyer n'y a été détecté depuis plus de 10 ans et que la TOT n'est pas effective chez *O. erraticus* avec les souches virales portugaises du génotype I ayant circulé jusqu'aux années 1990. Une partie des tiques échantillonnées a été mise en élevage au Cirad et l'autre partie a servi directement pour les essais d'infection et de transmission.

Les tiques sont maintenues à l'obscurité, dans une enceinte climatique avec une température et une humidité contrôlées à 27 °C et 80 % RH pour *O. porcinus* et *O. erraticus* et 25 °C et 80 % RH pour l'espèce *O. moubata*. Elles sont conservées dans des piluliers de 25 ml, dans lesquels sont placées des bandelettes type papier Whatman®, pliées en accordéon. Ces derniers servent de support aux tiques lors de leurs déplacements et absorbent leurs déjections. Le pilulier est recouvert d'un tissu de type moustiquaire ou mousseline suivant la taille des tiques, puis fermé par le bouchon préalablement percé (Figure 18). Chaque espèce de tiques est maintenue séparément, par stade et par sexe. Le gorgement des colonies d'élevage est réalisé sur membrane artificielle, de type parafilm®, sur sang hépariné non infecté, comme décrit dans le paragraphe B.1.

Lors des expériences d'infection et de transmission, les cohortes de tiques utilisées étaient composées des derniers stades nymphaux (Ny4 ou Ny5) et d'adultes (mâles et femelles).

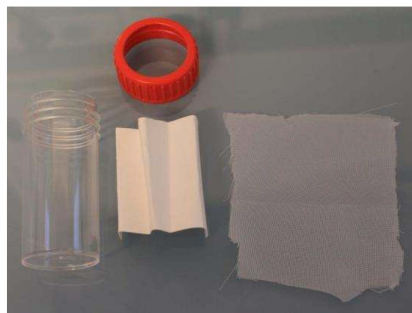


Figure 18: matériel utilisé pour maintenir les tiques molles en élevage.

3. Porcs domestiques

Les expérimentations avec le virus de la PPA doivent être réalisées dans des bâtiments confinés. Le virus étant classé en catégorie Ea3, les mesures de contrôle impliquent un confinement de niveau 3 avec filtration absolue de l'air, décontamination des effluents et élimination des déchets par autoclavage et des carcasses par incinération. De plus, des précautions doivent être prises par les personnels impliqués dans les expérimentations pour éviter la propagation des agents pathogènes manipulés. D'autre part, toute expérimentation sur animal implique en amont l'approbation du protocole d'expérimentation par un comité d'éthique qui veille à ce que l'utilisation des animaux en expérimentation soit solidement justifiée et appropriée. Ainsi, tous les essais sur porcs présentés dans ce manuscrit, incluant les mises au point, et les essais d'infection et de transmission, ont été préalablement validés par le Comité d'Éthique (ComEth Anses/ENVA/UPEC) enregistré sous le numéro 16 auprès du ministère de la recherche, avec les numéros d'accords suivant : saisine n°12-091, n° de l'Avis : 20/12/12-15 et saisine n°15-020, n° de l'Avis : 10/03/15-9 (Avis en Annexe 3).

Les animaux utilisés pour les essais d'infection et de transmission des espèces *O. moubata* et *O. porcinus* sont des porcs domestiques Large-White EOPS d'environ 8 à 9 semaines et pesant en moyenne 30 à 40 kg au début des essais. Pour limiter les effets interindividuels, les porcs sont répartis le plus équitablement possible dans chaque groupe en fonction de leur fratrie, de leur sexe, et de leur poids. Les porcs ont été bouclés sur une seule oreille et les animaliers ont pris soin de ne pas manipuler les animaux par les oreilles durant les essais. Les porcs étant des animaux sociaux, la réglementation en termes de bien-être animal impose qu'ils soient maintenus au minimum par deux. Pour des contraintes organisationnelles internes à l'Anses, les porcs utilisés dans les essais d'infection et de transmission par l'espèce *O. erraticus* sont des porcs Large-White conventionnels (et non EOPS) à haut statut sanitaire, de même âge et de même poids.

Le suivi des porcs par les animaliers se fait quotidiennement et les porcs reçoivent une alimentation *ad libitum*. Entre 1 à 3 jours avant le jour de l'infection expérimentale, les porcs sont évalués sur leur poids, leur température et leur bilan sanguin. Cela permet d'obtenir le point de référence.

B. Infection des tiques par deux méthodes de gorgement

1. Infection des tiques par gorgement artificiel.

L'étape clé lors des expérimentations d'infection des tiques par le virus de la PPA est le repas de sang infectieux. Les méthodes de gorgement artificiel permettent un contrôle *a priori* de la quantité de virus, contrairement aux gorgements naturels sur porc où la virémie ne peut être vérifiée qu'*a posteriori*. La méthode de gorgement artificiel permet aussi de réaliser un suivi individuel des tiques et/ou un gorgement de groupe. Dans une plaque à puits, sont placés du sang de porc hépariné et l'inoculum viral, ainsi qu'un agitateur magnétique pour éviter la sédimentation des globules rouges. Un morceau de parafilm® tendu recouvre le dessous de « l'unité de gorgement ». Cette unité est adaptée à la taille des puits utilisés, une plaque de 24 puits est préférable pour un gorgement individuel ou pour un petit groupe de nymphes Ny1–Ny3. Une plaque P6 sera plus adaptée pour un gorgement de grands groupes de tiques et de stades tardifs. Lors de la pose de l'unité dans le puits contenant le sang, il est nécessaire d'éviter au maximum l'apparition de bulles d'air pour avoir une surface de contact maximale avec le sang (Figure 19). Le dispositif est ensuite maintenu à 39 °C sur une plaque chauffante magnétique pour respecter les conditions naturelles du sang de porc. Il reste ensuite à placer le nombre de tiques désiré dans chaque unité de gorgement et de recouvrir d'un tissu et fermer par un élastique pour éviter les évasions. Pour stimuler les tiques à débiter plus rapidement le gorgement lors de repas de sang sur membrane, il est recommandé d'ajouter des poils de porcs et du papier absorbant frotté préalablement sur des porcs. Dans la mesure du possible, il faut mettre le dispositif à l'abri de la lumière. Le gorgement est terminé quand les tiques se sont décrochées du parafilm® et recommencent à bouger.

Pour garder un sang de gorgement de qualité nutritive et attractive suffisante, dilué par de la culture virale au maximum à 1/10 et à cause des difficultés que représente la production d'un stock viral de titre élevé, le titre viral dans le sang de gorgement artificiel n'a pas pu être supérieur à 10^5 HAD₅₀/ml. Toutefois un essai de gorgement artificiel a pu être réalisé directement à partir d'un prélèvement de sang de porc virémique d'une concentration supérieure à 10^7 HAD₅₀/ml. En tout, trois couples tique–virus ont été testés pour ces essais d'infection par gorgement artificiel sur membrane de parafilm® (Tableau 13).

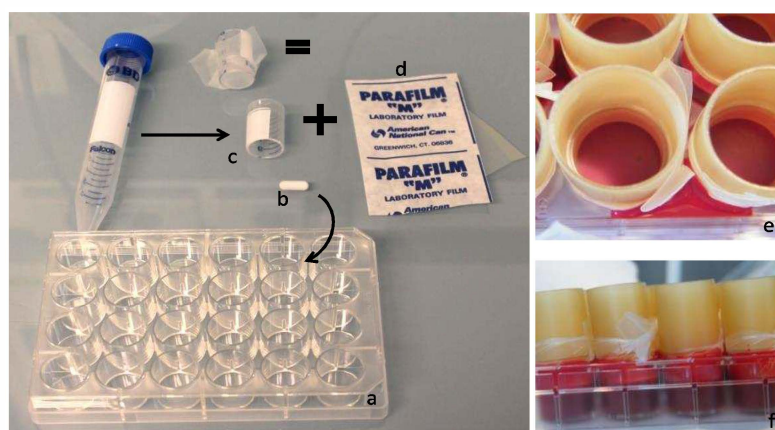


Figure 19: Dispositif de gorgement des tiques sur membrane artificielle sur plaque à puits.

a) plaque à puits, b) agitateur magnétique, c) unité de gorgement fabriquée à partir d'un falcon® 15 ml, d) parafilm®, e) dispositif vu de haut, f) dispositif de profil

Espèce de tiques	Souche virale	Nombre de tiques	Titre viral du repas de sang (HAD ₅₀ /ml)	Réalisation d'essai de transmission au porc
<i>O. porcinus</i>	Ambaton/02	59	10 ⁴	Non
<i>O. porcinus</i>	Ambaton/02	20	10 ⁴	Oui
<i>O. moubata</i>	Ambaton/02	54	10 ⁴	Non
<i>O. erraticus</i>	Georgia/2007/1	59	10 ⁵	Non
<i>O. erraticus</i>	Georgia/2007/1	60	10 ⁵	Oui
<i>O. erraticus</i>	Georgia/2007/1	37	10 ⁷	Non

Tableau 13: Récapitulatif des couples de tique-virus gorgées par gorgement artificiel sur membrane de parafilm®.

2. Infection des tiques par gorgement sur porc infecté

* Mise au point des gorgements sur porc

Des essais préliminaires en animalerie ont été réalisés en vue d'une validation du dispositif de gorgement des tiques sur les animaux vigils. Dans une première partie, deux porcs ont été utilisés. Ils ont été préalablement rasés à 5mm pour augmenter la surface de contact avec les tiques. Le porc n°3793 a reçu les dispositifs 1 et 2, le porc n°3762 les dispositifs 2 et 3 (Figure 20) :

- Dispositif n°1 : un pochon en coton est collé à la colle néoprène sur le flanc de l'animal.
- Dispositif n°2 : une boîte de Petri, entourée d'un tissu de type gaze en coton et fermée par un élastique, est posée sur la nuque de l'animal et maintenue avec des bandes adhésives de 10 cm de largeur. Par précaution, les bandes ont été placées en collier autour du cou de l'animal.

- Dispositif n°3 : ce même dispositif de boîte de Petri est posé sur l'oreille de l'animal et maintenu avec les mêmes bandes faisant tout le tour de l'oreille.

L'expérience a duré 2h, les deux porcs n'ont pas eu de vocalise et ont peu bougé, les résultats sont présentés dans le Tableau 14 et la Figure 21. Les dispositifs n°2 et n°3 ont été retenus pour la seconde partie de l'essai en présence de tiques.

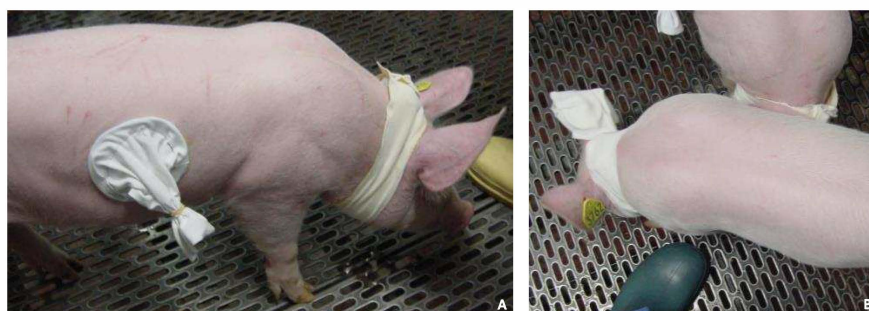


Figure 20: photographies représentant les dispositifs de pose des tiques sur les porcs.

A) Le porc 3793 a reçu le pochon encollé avec de la colle néoprène ainsi que la boîte de Petri sur la nuque. B) Le porc 3762 a reçu la boîte de Petri à la nuque et sur l'oreille.

N° et sexe du porc	Poids	Dispositif d'application des boîtes	Durée de pose	Observations	Validation pour l'utilisation avec tiques ?
3793 Mâle	22	Tonte au niveau du flanc et dispositif n°1	1h	Rougeur et irritation à l'endroit de la colle (Figure 21A). Risque de l'arracher en se grattant à la paroi.	Non
		Tonte à la nuque et dispositif n°2	1h30	Bonne tolérance de l'animal à la manipulation, mais marque de pression nette.	Oui
3762 Femelle	18,6	Dispositif n°3	1h30	Bonne tolérance mais marque de pression, diminution rapide de la marque en 15 min (Figure 21B)	Oui
		Tonte à la nuque et dispositif n°2	50 min	Tolérance moyenne, avec des coups de tête répétés. Peut-être due à un serrage trop important. Marques de profonde irritation (Figure 21C)	Oui

Tableau 14 : Déroulement et résultats de la première partie de l'essai, sans présence de tique des différents dispositifs de pose des tiques

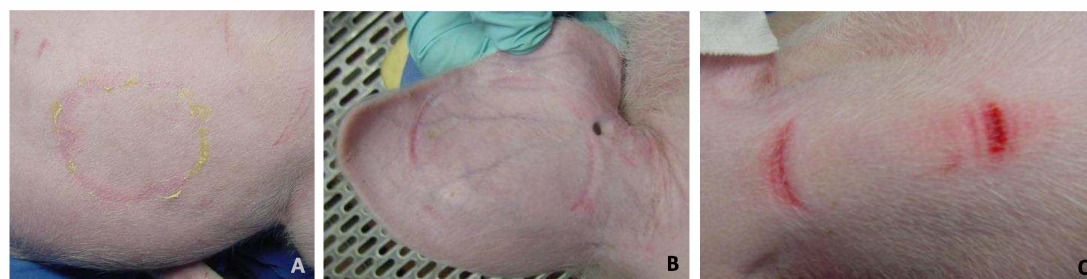


Figure 21: Photographies des effets des dispositifs de gorgement 2h après la pose lors de la première partie de l'essai sans présence de tique.

A) Irritation formée par le pochon encollé avec de la colle néoprène, B) pression due à la boîte de Petri sur l'oreille ; C) Irritation provoquée par la boîte de Petri sur la nuque après plusieurs mouvements de tête

La seconde partie de l'essai s'est déroulée avec 6 nouveaux porcs, afin de choisir la méthode de mise en place de boîtes de Petri contenant des tiques *O. moubata* adultes non infectées et le temps de gorgement des tiques, entre 2h et 4h30. L'utilisation de gaze, qui est un tissu facilement déformable, est à proscrire à cause du risque d'évasion des tiques. Suite à la préparation des boîtes de Petri contenant les tiques la veille, quatre tiques ont été retrouvées en dehors des dispositifs le lendemain matin. Un système de moustiquaire a donc été choisi pour la suite. Pour diminuer les marques d'irritation, un morceau de bande adhésive découpé en son centre a été apposé sur la peau avant d'y placer les boîtes de Petri (Figure 22A). Après la mise en place des boîtes de Petri, les porcs ont été installés dans des compartiments individuels (Figure 22B).

Au final, seul le porc n°3800 a été agité, à cause d'un compartiment plus grand que celui des autres porcs, empêchant les tiques de se gorger. Le taux de gorgement des autres tiques était de 100 % (Figure 22C). Les résultats sont présentés dans le Tableau 15. Pour connaître la réaction clinique des porcs vis-à-vis de ces morsures, quatre d'entre eux ont été suivis pendant 7 jours. Les deux autres ont été autopsiés le jour même en vue de préparer les expériences menées sur la salive de tique du chapitre 3.

Le dispositif retenu pour la suite a été la boîte de Petri sur l'oreille avec un temps de pose de 2 à 3h. L'utilisation de la bande adhésive apposée sur la peau a été abandonnée parce que des tiques se sont retrouvées collées dessous. Toutefois la bande adhésive a été transposée sur le contour de boîte de Petri pour éviter l'irritation de la peau du porc. Les tiques ne s'y collent pas si la bande est posée sans être étirée (Figure 23).



Figure 22 : Photographies de la seconde partie de l'essai avec la présence de tiques.

A) amélioration du dispositif de pose des boîtes de Petri, B) isolement des porcs pendant la période de gorgement des tiques, C) tiques *O. moubata* femelles gorgées à la fin de l'essai.

N° du porc Sexe	Poids du porc	Durée de pose	Disposition des tiques		Nombre de morsures	Tique gorgée	Commentaires
			Oreille	Nuque			
3786 mâle	24	2h	2♀		3	+	Morsure sur la veine circulante
				1♀	1	+	
3795 mâle	27	2h	1♂		1	+	
				2♂	2	+	
3788 mâle	20	4h30	2♀		2	+	Morsures sur le bord de la boîte
				1♂	3	+	
3794 mâle	22	4h30	2♀		4	+	Veine gonflée et piqûre sur la veine
				1♂	2	+	Morsure à travers la bande adhésive
3798 femelle	25	4h30	1♀		3	+	Autopsie du porc le jour même
				2♂	3	+	
3800 mâle	28	4h30	1♀		0	-	L'une des tiques de la nuque est dans un état médiocre à cause de l'agitation du porc. Le porc a été autopsié le jour même.
				2♂	2	+	

Tableau 15 : Résultats de la seconde partie de l'essai avec la présence de tiques disposées sur l'oreille ou sur la nuque sur 6 porcs.



Figure 23 : Boîte de Petri utilisée lors de gorgement des tiques sur porc vigile.

Sous la moustiquaire se trouve une bande adhésive protégeant les porcs des bords en plastique dur.

* Gorgement des tiques sur porcs infectés

Les inoculats viraux (mélange de culture virale et de MEM) qui ont servi à l'infection des porcs ont été utilisés à un titre de 10^3 HAD₅₀/porc. Deux porcs par souche virale ont été inoculés par injection intramusculaire. Le jour du déclenchement de l'hyperthermie des porcs, une prise de sang à la jugulaire est réalisée pour déterminer la charge virale sanguine par PCR temps réel. Suivant le résultat, les boîtes de tiques ont été posées sur les oreilles le lendemain ou le surlendemain pour cibler *a priori* un titre viral d'au moins 10^7 HAD₅₀/ml de sang. Le titrage du virus dans le sang prélevé le jour de la pose est systématiquement réalisé par la suite et a toujours confirmé cette hypothèse. Les couples tique–virus réalisés sont présentés dans le Tableau 16. Les porcs sont ensuite euthanasiés le lendemain de la pose des tiques.

Espèce de tiques	Souche virale	Nombre de tiques	Virémie du porc (HAD ₅₀ /ml)	Réalisation d'essai de transmission sur porc
<i>O. porcinus</i>	Ambaton/02	20	10^7	Oui
<i>O. porcinus</i>	Georgia/2007/1	20	$10^{7,1}$	Oui
<i>O. moubata</i>	Ambaton/02	20	10^7	Oui
<i>O. moubata</i>	Georgia/2007/1	20	$10^{7,1}$	Oui
<i>O. erraticus</i>	Georgia/2007/1	39	$10^{7,8}$	Oui

Tableau 16: Récapitulatif des tiques gorgées sur sang infectées par gorgement naturel sur porcs virémiques.

C. Expérience de transmission du virus par les tiques aux porcs sains

Après gorgement infectieux, les tiques sont maintenues vivantes 3 à 4 mois dans les enceintes climatiques avant d'être utilisées pour des essais de transmission au porc. Les tiques sont de nouveau posées sur les oreilles de porcs sains en utilisant le même système de boîte de Petri. Le Tableau 17 synthétise toutes les modalités de transmission étudiées, que ce soit le choix des couples tique (*O. porcinus*, *O. moubata* et *O. erraticus*) – virus (Ambaton/02 et Georgia/2007/1) ou la modalité d'infection des tiques (gorgement artificiel sur membrane ou gorgement naturel sur porc). L'essai de transmission du virus Georgia/2007/1 par des tiques *O. erraticus* gorgées sur porcs virémiques s'est déroulé un peu différemment, deux porcs (n°5513 et 5523) ont été mordus par les tiques et un porc a été gardé à leur contact sans pose de tiques (n°5514). Le porc n°5513 a été euthanasié à 10 Jpi pour un examen post-mortem complet. A 11 Jpi, le porc n°5514 a reçu une inoculation intramusculaire d'homogénat clarifié réalisé à partir du broyat des mêmes tiques *O. erraticus*-Georgia/2007/1 utilisées pour

l'expérience de transmission 11 jours plutôt. Le n°5523 est resté avec le n°5514 jusqu'à la fin de l'expérience.

Différents groupes témoins sont utilisés pour les expériences de transmission (Tableau n°18).

- Deux groupes témoins positifs en PPA nommés : « ID Ambaton/02 » et « ID Georgia/2007/1 », ont reçu cinq injections intradermiques (ID) de 200 µl à l'oreille avec une dose d'inoculum (culture virale diluée dans du MEM) de 10^4 HAD₅₀/porc des souches virales Ambaton/02 et Georgia/2007/1.
- Un groupe témoin MEM nommé « ID MEM » : Cinq inoculations intradermiques de 200 µl de MEM sont réalisées à l'oreille des porcs du groupe témoin.
- Un groupe témoin pour les tiques « *O. porcinus* non infectées » et un groupe témoin pour les tiques « *O. erraticus* non infectées »
- Un groupe témoin « Control » qui n'a subi aucune manipulation.

Espèce de tiques	Souche virale	Nombre de tiques	Titre viral du repas de sang infectieux (HAD ₅₀ /ml)	Modalité de gorgement infectieux	Nombre de porcs utilisés pour la transmission	Jours post-gorgement infectieux ⁽¹⁾
<i>O. porcinus</i>	Ambaton/02	15	10^5	membrane	3	45 à 78
<i>O. porcinus</i>	Ambaton/02	20	10^7	porc	2	54 à 63
<i>O. porcinus</i>	Georgia/2007/1	20	$10^{7,1}$	porc	2	54
<i>O. moubata</i>	Ambaton/02	18	10^7	porc	2	54
<i>O. moubata</i>	Georgia/2007/1	18	$10^{7,1}$	porc	2	54
<i>O. erraticus</i>	Georgia/2007/1	43	10^5	membrane	6	108
<i>O. erraticus</i>	Georgia/2007/1	39	$10^{7,8}$	porc	2 (+1*)	157

Tableau 17: Récapitulatif des essais de transmission réalisés à partir de tiques gorgées sur sang infecté par membrane artificielle ou sur porc virémique.

*L'essai de transmission des tiques *O. erraticus* gorgées sur porc virémique Georgia/2007/1 a été réalisé sur 2 porcs, mais un troisième porc, n°5514 était présent en tant que contact. Il a reçu après 11 Jpi une inoculation intramusculaire d'homogénat clarifié réalisé à partir du broyat des mêmes tiques *O. erraticus* utilisé pour la transmission. ⁽¹⁾ Délai entre le gorgement infectieux et l'essai de transmission sur porc.

Groupe de porcs	Contrôle négatif				Contrôle positif	
	ID MEM	<i>O. porcinus</i> non infectées	<i>O. erraticus</i> non infectées	Control	ID Ambaton/02	ID Georgia /2007/1
nombre de porcs	3	3	3	4	3	6

Tableau 18: Récapitulatif des groupes de porcs témoins utilisés pour les essais de transmission du virus par les tiques.

Pour le suivi des porcs, les températures rectales sont relevées quotidiennement ainsi que l'évaluation du refus alimentaire. Les signes cliniques sont scorés selon la grille clinique décrite par (King *et al.*, 2011) (Annexe 4). La pesée se fait 1 à 2 fois par semaine afin de déterminer le Gain Moyen Quotidien (GMQ). Le sacrifice des animaux est envisagé immédiatement lorsque le score clinique total est supérieur à 15/40 pendant deux jours consécutifs. Lorsque les porcs sont euthanasiés, par inoculation à la jugulaire de thiopental-sodique (20 mg/kg), un examen post-mortem est pratiqué suivant une grille d'examen précise d'observation de chaque organe, et des organes sont prélevés pour analyse (Annexe 5). Au cours de l'expérience, des prélèvements sanguins ont été réalisés sur chaque animal, avant l'infection puis à des intervalles réguliers allant de 1 à 3 jours suivant les besoins analytiques et l'état de l'animal. Deux types de tubes ont été utilisés pour les prélèvements de sang. Le sang prélevé sur « tube hépariné » (Vacuette 9 ml clinical chemistry, lithium heparin Greiner Bio-One, Dutscher, France) est conservé à -70 °C afin de quantifier par la suite la virémie, par un titrage sur macrophages alvéolaires porcins. Le second tube est un « tube EDTA » (Vacuette 4 ml haematology, EDTA-K3 Greiner Bio-One Dutscher, France) utilisé pour rechercher la présence du génome viral par la PCR en temps réel mise au point par (Tignon *et al.*, 2011) sur organes et sur sang, après avoir extrait l'ADN avec le kit DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). La détection du génome viral dans les échantillons pour lesquels les Ct obtenus étaient supérieurs à 40 a été vérifiée par un isolement viral pour éliminer les résultats faussement positifs. Les organes prélevés lors des autopsies sont conservés à -70 °C pour une future détection du génome viral par PCR.

D. Méthode de détection/quantification du virus chez la tique

1. Par isolement viral

Une des méthodes les plus utilisées pour la détection du virus dans les tiques est l'isolement viral, et le titrage sur culture cellulaire lorsque l'on souhaite le quantifier. Avant tout essai de détection virale, les tiques sont lavées individuellement dans 3 bains successifs de 1 ml de PBS 1X. Elles sont placées dans des tubes de 2 ml à fond conique avant d'être congelées à -70 °C. Elles sont ensuite broyées dans 200 µl de MEM par 2 billes de 4 mm de diamètre en acier et durant 5 cycles de 3 minutes à température ambiante à une fréquence d'agitation de 25 Hz par un Tissue Lyser (Tissue Lyser II, Qiagen, France), puis le volume est complété à 1 ml. Deux nouvelles phases de congélation/décongélation sont effectuées avant que le surnageant ne soit utilisé.

Les premiers essais de titrage ont été réalisés d'après le même protocole que celui utilisé pour le stock viral. Cependant un phénomène d'hémadsorption aspécifique a été observé, rendant le résultat ininterprétable (Figure 24). De plus, aucune répllication virale n'a pu être mise en évidence par PCR sur les cultures présentant une hémadsorption aspécifique dans les fortes dilutions, ce qui laisse présager qu'une faible quantité de virus dans les tiques ne pourrait pas être mise en évidence avec cette technique. Cette difficulté de lecture d'un titre viral à partir de tiques est aussi constatée par (Oura *et al.*, 2013), sans toutefois donner d'indication (ou de contre-indication) particulière sur son utilisation.

La lecture de l'hémadsorption sur culture de macrophages alvéolaires porcins étant trop subjective en présence de surnageant de broyat de tiques, le choix de rechercher l'ADN viral par la PCR en temps réel UPL a été fait pour la suite des analyses réalisées sur broyat de tiques.

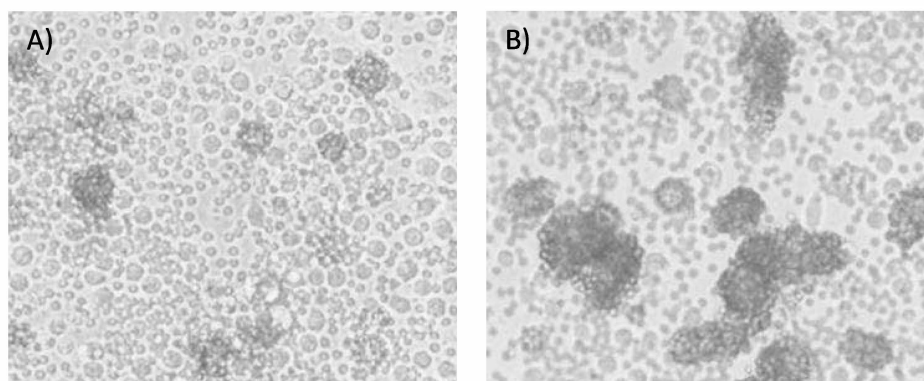


Figure 24 : Observation de macrophages alvéolaires porcins infectés par le virus de la PPA (objectif X10). A) Phénomène d'hémadsorption, les rosettes sont à différents stades de formation ; B) Phénomène d'hémadsorption aspécifique lors d'ajout de surnageant de tiques clarifié.

2. Par PCR temps réel

Le surnageant des broyats de tiques, dont la préparation est présentée dans le paragraphe précédent, a été utilisé pour l'extraction d'ADN, par le kit commercial High Pure PCR Template Préparation Kit (Roche Diagnostics, Penzberg, Allemagne).. La détection de l'ADN viral a ensuite été réalisée par une PCR en temps réel décrite par Fernandez-Pinero (Fernandez-Pinero *et al.*, 2012) utilisant la sonde UPL#162 (universal probe library, Roche Diagnostics, Penzberg, Allemagne). La PCR UPL a été utilisée chez les tiques préférentiellement à celle de (Tignon *et al.*, 2011) car les essais inter-laboratoire sur les méthodes de diagnostic et de

détection de la PPA chez les animaux ont montré que certains échantillons étaient mieux détectés par la PCR UPL (CISA-INIA, 2014b, CISA-INIA, 2014a).

Les premiers essais de détection du génome viral réalisé à partir d'un extrait de broyat de tiques entières ont montré que la présence de surnageant de broyat de tique inhibe partiellement le résultat de la PCR (Figure 25). Dans ces essais préliminaires, une gamme de dilution virale est réalisée à partir d'un stock viral de titre connu. Dans les tests réalisés sur le couple *O. moubata*–Ambaton/02, 50 µl d'un point de dilution du stock viral sont ajoutés à 200 µl d'un surnageant de tique. Le surnageant est préparé à partir d'un homogénat de plusieurs tiques femelles entières broyées dans 1 ml de MEM (Figure 25A). Les tests du couple *O. erraticus*–Georgia/2007/1, ont été réalisés par Caroline Fano (Fano, 2015). Le surnageant de tiques est préparé à partir d'un homogénat de plusieurs tiques nymphes d'*O. erraticus* entières broyées dans 1 ml de MEM. À cinq échantillons contenant tous 100 µL de surnageant de tiques, sont ajoutées respectivement 900, 450, 150, 15 et 1,5 particules vivantes de virus de la souche Georgia2007/1. Chaque échantillon est ensuite ajusté à 250 µL avec du milieu MEM (Figure 25B). Que ce soit pour le couple *O. moubata*–Ambaton/02 ou le couple *O. erraticus*–Georgia/2007/1, le signal d'amplification du génome viral après ajout de surnageant de tiques dans la gamme de dilution est systématiquement retardé (Ct plus tardif). La détection d'ADN par PCR Temps Réel pour les fortes dilutions du stock viral montre qu'il y a probablement une forte présence d'ADN libre ne correspondant pas à des particules virales vivantes. Les résultats de Ct au-delà de 40 (entre 40 et 45) sont éliminés lorsque les courbes sont « plates », correspondant à un signal d'amplification aspécifique.

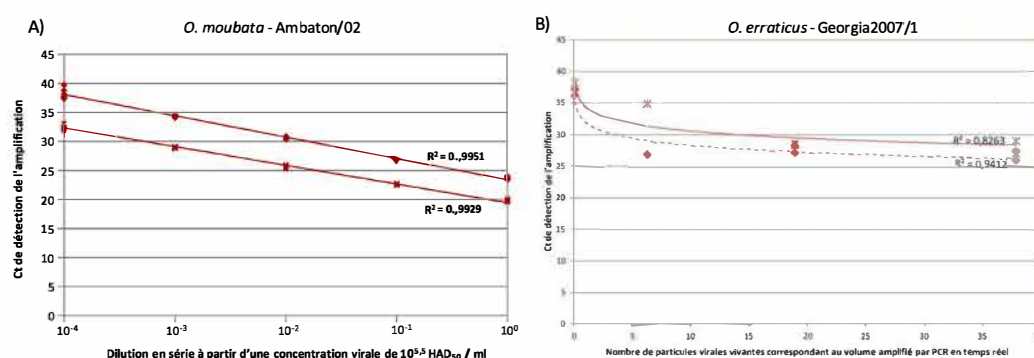


Figure 25 : Graphique représentant les résultats (Ct) de PCR temps réel sur des dilutions en série avec ou sans ajout d'un surnageant de tiques.

A) Extraction d'ADN viral Ambaton/02 sans surnageant de tiques (étoile) (courbe du haut) ou avec un surnageant de tiques *O. moubata* (losange) (courbe du bas) ; B) Extraction d'ADN viral Georgia/2007/1 avec surnageant de tiques (étoile) (courbe du haut) ou sans surnageant de tiques *O. erraticus* (losange) (courbe du bas), les résultats B) ont été réalisés par Caroline Fano.

L'expérience d'inhibition A) de la Figure 25 a été réalisée sur de grosses femelles *O. moubata* gorgées environ 1 mois avant d'être broyées, alors que l'expérience B) a été réalisée à partir de nymphes *O. erraticus*, beaucoup plus petites. L'inhibition observée pourrait avoir 2 causes principales. D'une part, elle peut être liée à la quantité de sang prise par la tique lors de son repas de sang (Tableau 19) et au temps de digestion laissé entre l'analyse et le gorgement. D'autre part, elle peut être fonction de la taille de la tique étudiée (espèce, stade). En effet, les polysaccharides contenus dans la cuticule des tiques sont connus pour être d'importants inhibiteurs (Halos *et al.*, 2004) et seront probablement plus nombreux dans les plus grosses tiques.

		Sang absorbé (g)		Poids après gorgement (g)		Nombre de tiques
		moyenne	écart-type	Moyenne	Écart-type	
<i>O. moubata</i>	Femelle	0,179	0,08	0,252	0,086	160
	Mâle	0,023	0,011	0,051	0,015	36
<i>O. porcinus</i>	Femelle	0,141	0,097	0,187	0,104	40
	Mâle	0,025	0,010	0,048	0,014	12
<i>O. erraticus</i>	Femelle	0,013	0,007	0,021	0,008	155
	Mâle	0,003	0,001	0,006	0,002	116

Tableau 19 : Exemple de quantité de sang absorbé par des tiques adultes lors d'un repas sur sang sain par gorgement artificiel sur membrane des trois espèces de tiques *O. moubata*, *O. porcinus* et *O. erraticus*.

Le poids après gorgement a été évalué après la sécrétion de liquide coxal.

Afin de gommer ces variations interindividuelles de taille, de stade ou d'état de gorgement, nous avons donc choisi d'analyser les données de Ct de manière semi-quantitative en les utilisant par classe. Le seuil que nous avons choisi pour considérer les tiques comme étant infectées ou non est de 36 Ct. Il est déterminé en fonction des résultats de détection du génome viral dans les tiques le jour du gorgement infectieux sur membrane. Les résultats de Ct au-dessus de 36 (entre 36 et 45 Ct) seront considérés comme de l'ADN résiduel ou comme du virus incapable d'infecter les tiques, et les résultats « No Ct » comme négatifs. Les résultats inférieurs (entre 20 et 36 Ct) indiqueront que le virus a été en mesure de se multiplier dans les tiques et de les infecter.

E. Calendrier de disponibilité des tiques et planning des expérimentations

Un des facteurs les plus contraignants de ces expériences a été de faire correspondre le calendrier d'élevage des tiques : délai de production d'une quantité de tiques adultes suffisante (environ 8 à 12 mois) pour les essais d'infection et délai nécessaire entre le gorgement infectieux et les essais de transmissions (entre 2 et 5 mois); et le calendrier des essais expérimentaux sur porcs, qui doivent être planifiés au moins 1 an à l'avance : temps de production des porcs EOPS et disponibilité des locaux. Malgré le fait que l'élevage des tiques ait débuté un an avant les essais de transmission et qu'un soin particulier ait été apporté à l'élevage des tiques *Ornithodoros*, ces organismes vivants restent soumis à leur propre rythme biologique et aux conditions de laboratoire dans lesquelles ils sont maintenus. Le nombre d'adultes disponibles au moment opportun a au final été assez restreint. Les tiques ont donc été prioritairement utilisées pour des essais d'infection, suivis d'essais de transmission sur porc. Une soixantaine de tiques était disponible pour l'espèce *O. porcinus* (20 tiques pour infection sur membrane et 40 pour infection sur porc virémique par les 2 souches virales) et 40 pour l'espèce *O. moubata* à partager aussi entre les 2 souches virales. Les *O. erraticus* étant récoltées sur le terrain avant l'expérience, la quantité d'adultes utilisables a été un peu plus importante, 60 pour une infection sur membrane et 30 pour une infection sur porcs virémiques.

De plus, connaître le statut infectieux des tiques n'est pas possible sans les tuer. Donc, au vu des calendriers d'expérimentations, il n'a pas été possible de produire assez de tiques adultes pour connaître leur statut infectieux avant les essais de transmission, d'autant que les problèmes méthodologiques liés à la détection/quantification virale dans les tiques n'étaient pas encore résolus. Ainsi, les résultats d'infection des tiques décrits par la suite ont surtout été produits en parallèle ou après les essais de transmission sur porc.

III. Résultats

A. Résultats d'infection des tiques

En ce qui concerne les tiques gorgées sur membrane artificielle avec un titre viral de moins de 10^6 HAD₅₀/ml de sang, aucune *O. porcinus* ni *O. erraticus* ne présente de résultats de détection du génome viral inférieurs à 36 Ct, et ceci quel que soit le virus (Tableau 20 et Figure 26). Elles sont majoritairement négatives pour *O. porcinus* et seulement 9/93 présentent des résultats entre 36 et 45 Ct. Ce chiffre est un peu plus élevé pour *O. erraticus* avec 35/100 tiques présentant des résultats supérieurs à 36 Ct. La détection du génome viral chez *O.*

moubata montre par contre que 4/53 tiques présentent un résultat inférieur à 36 Ct correspondant à une multiplication virale. Toutefois, 30/53 sont négatives et le résultat obtenu pour les 19 autres correspond à du virus résiduel. Au contraire, 33/37 tiques *O. erraticus* gorgée avec du sang virémique Georgia/2007/1 à 10^7 HAD₅₀/ml sont retrouvées infectées (de 20 à 33 Ct).

Chez les tiques qui ont été échantillonnées à différents temps (*O. porcinus* et *O. moubata* avec Ambaton/02 et *O. erraticus* avec Georgia/2007/1), il semble y avoir un effet temps qui se caractérise par une diminution progressive des proportions de tiques positives et/ou supérieures à 36 Ct par rapport aux tiques négatives (No Ct).

La détection du génome viral dans les tiques gorgées sur porc virémique avec un titre supérieur à 10^7 HAD₅₀/ml de sang, des espèces *O. porcinus* et *O. moubata*, a été réalisée plus de 300 jours après le gorgement sur sang infectieux et l'essai de transmission sur porc. Elles avaient été conservées plus longtemps pour une potentielle utilisation à cause de leur importance (expérience unique et faible nombre de tiques). Il s'avère qu'aucune tique *O. porcinus* gorgée sur porc virémique avec le virus Ambaton/02 ou Georgia/2007/1 ne présentait d'infection, avec respectivement 13/20 et 14/20 tiques ne présentant aucune amplification (No Ct). Les résultats sont similaires pour le couple *O. moubata*–Georgia/2007/1. En revanche, le résultat de détection du génome viral chez le couple *O. moubata*–Ambaton/02 indique que 2/20 peuvent être considérées comme infectées après plus de 300 jours, les autres sont pour 4/20 supérieures à 36 Ct et 14/20 négatives. Quant à la détection du génome viral dans les tiques *O. erraticus*, il s'avère que 31/39 tiques présentent un résultat de Ct inférieur à 36 et sont donc considérées infectées. Lors du gorgement infectieux sur porc virémique, un groupe de 17 tiques a été considéré comme non gorgées, vu la difficulté d'évaluation *de visu* du succès de gorgement après 3h de pose sur les porcs, elles ont tout de même été analysées. Il s'avère que les 6 tiques No Ct faisaient partie de ce groupe. Cependant, du génome viral a été détecté dans les 9 autres. Enfin, pour savoir si les virus détectés par PCR en temps réel étaient vivants et capables d'induire la maladie chez le porc, les broyats des 8 tiques présentant les résultats de Ct entre 22 et 28 ont été titrés sur culture cellulaire et ont montré un titre compris entre moins de $10^{2,8}$ et 10^5 HAD₅₀/ml de tique (Tableau 21).

Tique	Souche virale	Gorgement Infectieux	Jours post-gorgement infectieux	Nombre de tiques			Nombre total de tiques
				<36 ct	≥36 ct	No Ct	
<i>O. porcinus</i>	Ambaton/02	Membrane 10 ⁴	0	0	21	0,0	21
			< 60	0	4	56	60
			> 61	0	5	28	33
<i>O. porcinus</i>	Ambaton/02	Porc	0	-	-	-	-
			< 60	-	-	-	-
			> 61 ⁺	0	7	13	20
<i>O. moubata</i>	Ambaton/02	Membrane 10 ⁴	0	-	-	-	-
			< 60	1	5	2	8
			> 61	3	14	28	45
<i>O. moubata</i>	Ambaton/02	Porc	0	-	-	-	-
			< 60	-	-	-	-
			> 61 ⁺	2	4	14	20
<i>O. porcinus</i>	Georgia/2007/1	Porc	0	-	-	-	-
			< 60	-	-	-	-
			> 61 ⁺	0	6	14	20
<i>O. moubata</i>	Georgia/2007/1	Porc	0	-	-	-	-
			< 60	-	-	-	-
			> 61 ⁺	0	6	14	20
<i>O. erraticus</i>	Georgia/2007/1	Membrane 10 ⁴	0	0	9	4	13
			< 60	0	22	17	39
			> 61	0	13	48	61
<i>O. erraticus</i>	Georgia/2007/1	Membrane 10 ⁷	0	-	-	-	-
			< 60	27	0	4	31
			> 61	6	0	0	6
<i>O. erraticus</i>	Georgia/2007/1	Porc	0	-	-	-	-
			< 60	-	-	-	-
			> 61	31	2	6*	39

Tableau 20: récapitulatif des résultats de détection virale par PCR temps réel des tiques gorgées sur sang infecté. + Résultat de détection après plus de 300 Jpi ; * Ces tiques ont été en première intention classées comme non gorgées lors du repas infectant. Les résultats sont catégorisés en inférieur à 60 Jpi et supérieur à 61 Jpi suite à l'analyse du chapitre 1 qui montre que l'infection des tiques est rapide, inférieure à 1 mois

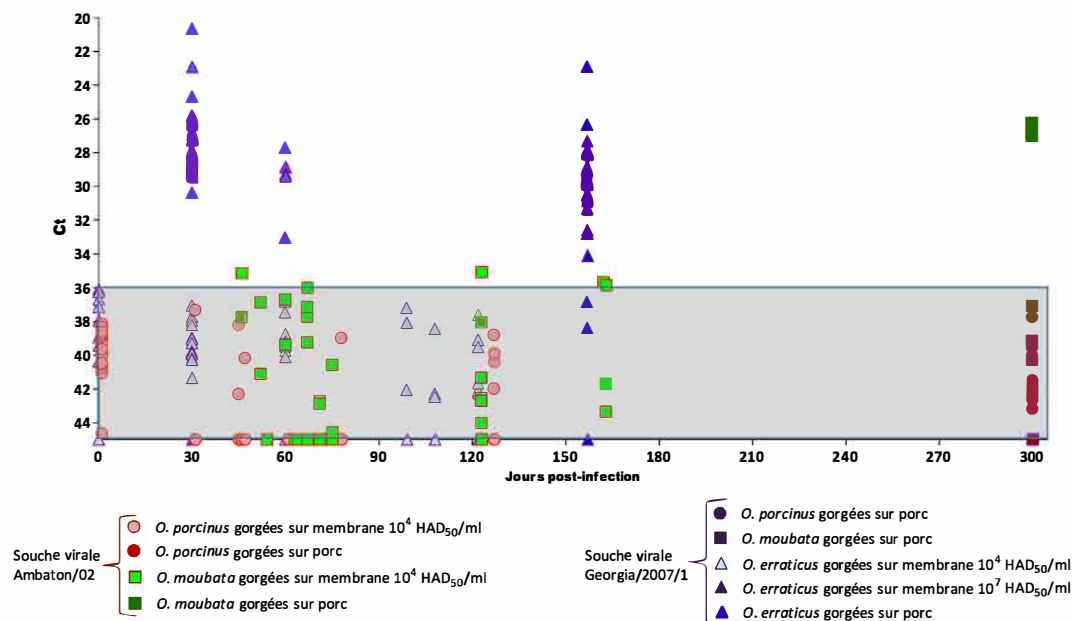


Figure 26: Résultats de la détection du génome viral par PCR en temps réel dans un broyat de tiques entières. La zone grisée, entre 36 et 45 Ct correspond à de l'ADN viral résiduel. Seules les tiques présentant un Ct < à 36 sont considérées comme infectées.

	Résultat de détection du génome viral (Ct)	Titrage (HAD ₅₀ /ml)	réalisation de l'homogénat (µl)
Tique 1	22,9	10 ⁵	50
Tique 2	26,3	10 ^{4,5}	50
Tique 3	27,3	<10 ^{2,8}	100
Tique 4	27,8	<10 ^{2,8}	100
Tique 5	28,0	10 ³	100
Tique 6	28,1	10 ^{3,8}	100
Tique 7	28,1	10 ^{3,3}	100
Tique 8	28,9	<10 ^{2,8}	200
25 autres tiques	Entre 29 et 38,3	-	25*200 µl
total inoculum	-	10 ^{3,9}	6 ml

Tableau 21: Résultats de la détection du virus par PCR en temps réel et par titrage des *O. erraticus* gorgées sur porc virémique Georgia/2007/1.

La dernière colonne représente la quantité de chaque broyat de tique (réalisé dans 1 ml de MEM) ajoutée dans l'homogénat utilisé pour l'inoculation du porc contact n°5514.

B. Transmission

1. Détection du virus sur les moustiquaires de contact tiques – porc.

Les moustiquaires qui entourent la boîte de Petri contenant les tiques se retrouvent ensanglantées après le gorgement des tiques sur les porcs. L'utilisation de porcs sains lors des essais de transmission implique que s'il y a une détection du génome viral sur la moustiquaire, alors elle ne peut provenir que des tiques. Du génome viral a donc été recherché sur ces moustiquaires après l'essai de transmission sur porc. Les résultats sont négatifs en ce qui concerne tous les essais de transmission avec les tiques *O. moubata* et *O. porcinus*, quel que soit le virus, ainsi que pour l'essai *O. erraticus* gorgées artificiellement sur sang infecté. Ce résultat est cohérent avec le fait de ne pas avoir trouvé de tiques infectées pour ces couples tiques-virus dans ces conditions de gorgement (sauf pour une très faible proportion d'*O. moubata*–Ambaton/02).

Cependant, du génome viral a été détecté sur les moustiquaires de l'essai de transmission sur porc des *O. erraticus* infectées sur porc virémique Georgia/2007/1 (39,8 Ct \pm 1,0 sur 3 éluats de moustiquaire). En revanche, le virus n'a pu être isolé sur culture cellulaire. Le résultat d'infection de ces tiques a montré *a posteriori* qu'elles étaient infectées et que du virus peut être isolé sur macrophages alvéolaires porcins pour au moins 8 d'entre elles (Tableau 21).

2. Résultats du suivi des porcs

* Suivi clinique et température

Aucun porc mordu par des tiques précédemment gorgées sur du sang infecté (sur membrane ou sur porcs), ou des groupes contrôles négatifs (Contrôle, ID MEM, tique *O. porcinus* et *O. erraticus* gorgées sur sang sain) n'a présenté de signes cliniques durant tout l'essai. Seuls les porcs des groupes témoins ayant reçu une inoculation de virus (ID Georgia/2007/1, ID Ambaton/02) ont présenté des symptômes caractéristiques de la maladie. Cela a débuté par une perte d'appétit, puis la température des animaux a rapidement augmenté dès 2 à 3 Jpi. L'hyperthermie (>40 °C) a ensuite duré jusqu'à l'euthanasie, à 5 ou 6 Jpi (Figure 27). Les porcs sont aussi devenus apathiques, ont tous perdu du poids et présenté des diarrhées, puis une jaunisse pour certains.

En outre, afin de vérifier que le virus contenu dans les tiques *O. erraticus* présentant un résultat PCR temps réel positif était infectieux, un inoculum a été constitué à partir des homogénats des 8 tiques titrées et de 25 autres positives non titrées, et a été inoculé en

intramusculaire au porc contact n°5514 à 11 Jpi. Ce porc a lui aussi présenté des symptômes caractéristiques et a dû être euthanasié après 6 jours.

En ce qui concerne l'essai de transmission d'*O. erraticus* gorgées sur porcs virémiques Georgia/2007/1, le porc n°5513 ayant été mordu par les tiques a été euthanasié à 10 Jpi pour vérifier son statut infectieux dans le sang et les organes avant que le broyat de tiques ne soit inoculé au porc contact le lendemain, à 11 Jpi. Le protocole de suivi quotidien des deux porcs restants (le contact n°5514 et le second mordu par les tiques n°5523) a été appliqué comme précédemment. Le porc n°5514 a déclenché des symptômes de la maladie, contrairement au porc n°5523 qui n'a pas présenté d'hyperthermie, ni d'autres signes cliniques jusqu'à la fin de l'expérience (17 Jpi, soit 6 jours après l'inoculation du broyat).

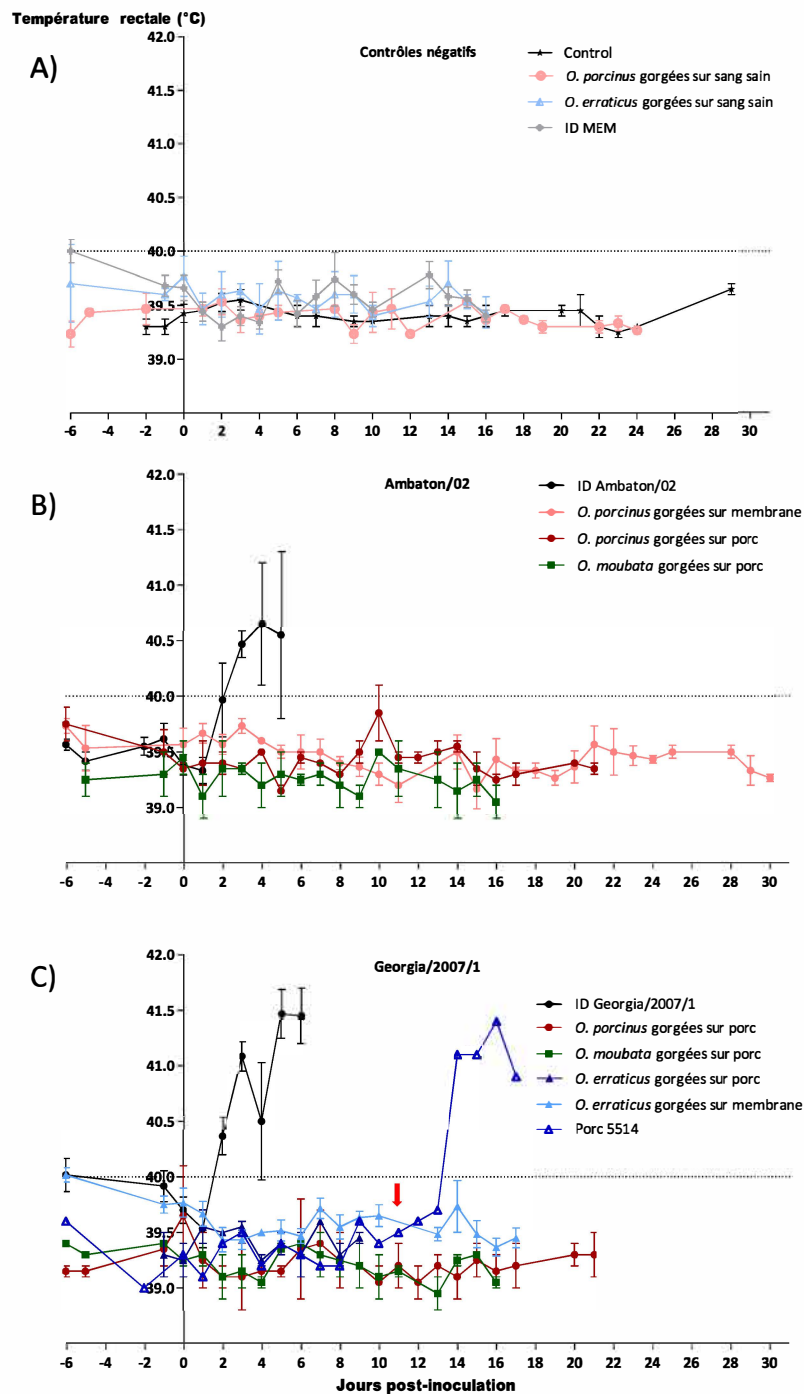


Figure 27: Graphique des moyennes par groupe de porcs et par jour, des températures rectales des porcs des essais de transmission.

A) Groupes de porcs témoins n'ayant pas reçu de virus ; B) Groupes de porcs ayant reçu la souche virale Ambaton/02 ou des tiques s'étant gorgées précédemment sur du sang contenant cette souche virale ; C) Groupes de porcs ayant reçu la souche virale Georgia/2007/1 ou des tiques s'étant gorgées précédemment sur du sang contenant cette souche virale, le porc n°5514 a reçu une inoculation intramusculaire (symbolisée par la flèche rouge) de broyat de tiques *O. erraticus* gorgées sur porc virémique Georgia/2007/1.

* Examen post mortem

Lors des examens post-mortem réalisés sur les animaux à la fin des expérimentations, en plus des organes habituellement considérés (cœur, rate, poumons, estomac, foie, reins...), les ganglions ont particulièrement été observés : ganglion parotidien du côté de l'inoculation ou de la pose de tiques (GPI) ; ganglion parotidien du côté opposé (GPO) ; ganglion hépato-stomacal (GHS) ; ganglion mésentérique, ganglion iliaque, ganglion inguinal et ganglion rétropharyngé. Les résultats ont ensuite été scorés en fonction de l'intensité des lésions (Tableau 22).

L'examen post mortem des porcs des groupes témoins sans virus s'est révélé normal, sans lésion particulière. Seul le groupe mordu par *O. porcinus* gorgées sur sang non infecté présente des ganglions hépato-stomacaux réactifs (Tableau 23A). Les porcs ayant été mordus par des tiques précédemment gorgées par du virus Ambaton/02 ne présentent pas non plus de lésions post mortem particulières, tout comme ceux mordus par des tiques *O. porcinus* et *O. moubata* précédemment gorgées par du virus Georgia/2007/1. Les lésions observées sur les porcs mordus par des *O. erraticus* gorgées sur membrane avec la souche Georgia/2007/1 peuvent s'expliquer par l'utilisation de porcs non EOPS, mais conventionnels de haut statut sanitaire lors de cet essai (Tableau 23C).

Les porcs ayant été inoculés avec du virus montrent quant à eux des signes caractéristiques de lésions d'organes d'animaux infectés par le virus de la PPA : une rate noire et friable, un thymus effondré, des ganglions hémorragiques, et de l'ictère.

Organe	Score
Ganglion réactif	0 à 2
Ganglion congestionné	4
Ganglion hémorragique	6
Rate noire à l'extrémité	1
Rate noire	4
Rate noire + friable	6
Thymus points rouges	1
Thymus à moitié effondré	3
Thymus effondré	6
Présence d'ictère	0 à 6

Tableau 22 : Score des organes en fonction de l'intensité des lésions après un examen post-mortem des animaux.

A)

	Contrôle négatif			
	ID MEM	<i>O. porcinus</i> (sang sain)	<i>O. erraticus</i> (sang sain)	Control
Rate	0,3 ± 0,5	0	0	0
GPI	0	0	0	0
GPO	0	0	0	0
GHS	0,3 ± 0,5	1,3 ± 2,3	0,3 ± 0,5	0
GA	0	0	0	0
Ictère	0	0	0	0
Thymus	0	0	0	0,25 ± 0,5
Total	0,6 ± 0,5	1,3 ± 2,3	0,3 ± 0,5	0,25 ± 0,5
nombre de porcs	3	3	3	4

B)

	Ambaton/02			
	ID Ambaton/02	<i>O. porcinus</i> gorgées sur mem- brane	<i>O. porcinus</i> gorgées sur porc	<i>O. moubata</i> gorgées sur porc
Rate	4 ± 0	0	0	0
GPI	3,3 ± 1,1	0	0	0
GPO	3,3 ± 1,1	0	0	0
GHS	4 ± 0	0	0	0
GA	3,6 ± 0,5	0	0	1 ± 0
Ictère	6 ± 0	0	0	0
Thymus	3,3 ± 2,8	0	0	0
Total	27,6 ± 2,8	0	0	1 ± 0
nombre de porcs	3	3	2	2

C)

	Georgia/2007/1						
	ID Georgia/2007/1	<i>O. erraticus</i> gorgées sur membrane	<i>O. erraticus</i> gorgées sur porc			<i>O. porcinus</i> gorgées sur porc	<i>O. moubata</i> gorgées sur porc
			5513	5523	5514 *		
Rate	4,6 ± 1,5	0,5 ± 0,8	0	0	6	0	1 ± 0
GPI	3,1 ± 1,1	0,5 ± 0,8	0	0	2	0	0
GPO	3,1 ± 1,1	0,5 ± 0,8	0	0	2	0	0
GHS	5,3 ± 1,0	0	0	0	6	0	0
GA	3,1 ± 1,1	0,5 ± 0,8	0	2	4	0,5 ± 0,7	3 ± 1,4
Ictère	2,6 ± 2,7	0	0	0	0	0	0
Thymus	2,3 ± 2,9	1 ± 1,5	0	0	0	0	0
Total	24,5 ± 5,2	3,0 ± 4,2	0	2	20	0,5 ± 0,7	4 ± 1,4
nombre de porcs	6	6	1	1	1	2	2

Tableau 23: Localisation des lésions post-mortem par groupe de porcs (moyenne et les écarts-type des scores).
A) porcs n'ayant pas reçu de virus ; B) porcs ayant été inoculés avec du virus Ambaton/02 ou mordu par des tiques précédemment gorgées sur du sang qui en contenait ; C) porcs ayant été inoculés avec du virus Georgia/2007/1 ou mordus par des tiques précédemment gorgées sur du sang qui en contenait. *Le porc 5514 est celui qui a reçu l'inoculation de broyat de tiques *O. erraticus* infectées par la souche Georgia/2007/1 ; GPI : ganglion parotidien du côté de l'inoculation ; GPO : ganglion parotidien du côté opposé ; GHS : ganglion hépato-stomacal ; GA : autres ganglions (ganglion mésentérique, ganglion iliaque, ganglion inguinal et ganglion rétropharyngé).

* Détection virale dans les organes et le sang

La recherche de virus dans le sang et les organes des animaux s'est révélée négative pour tous les porcs des groupes témoins négatifs et des groupes mordus par des tiques (Tableau 24A). Même pour le porc n°5513 mordu par les tiques *O. erraticus* infectées par le virus Georgia/2007/1.

Dans les groupes de porcs témoins positifs avec inoculation de virus par contre, le génome viral a été détecté en forte quantité dans tous les organes testés (Ct < 20) (Tableau 24B et C). En ce qui concerne le porc 5514 ayant reçu une inoculation de broyat clarifié de tiques infectées à 11 Jpi, les résultats montrent qu'il était infecté par le virus. Ses organes présentent une forte quantité de génome viral, 6 jours après l'inoculation. Quant au porc 5523, mordu aussi par des tiques *O. erraticus* infectées par le virus Georgia/2007/1, une prise de sang a été réalisée à 11 Jpi avant d'inoculer le n°5514. Les résultats ont montré que ce porc n'était pas infecté par le virus ce jour là. Il est cependant resté en contact du porc 5514 après son inoculation et ils ont été tous les deux euthanasié le même jour. Les résultats de la détection du génome viral dans ses organes montrent que le virus avait réussi à l'infecter.

A)		Contrôle négatif			
		ID MEM	<i>O. porcinus</i> (sang sain)	<i>O. erraticus</i> (sang sain)	Control
Amygdales	-	-	-	-	-
Ganglion	-	-	-	-	-
Rate	-	-	-	-	-
Sang	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct
nombre de porcs	3	3	3	3	4

B)		Ambaton/02			
		ID Ambaton/02	<i>O. porcinus</i> gorgées sur membrane	<i>O. porcinus</i> gorgées sur porc	<i>O. moubata</i> gorgées sur porc
Amygdales	17,4	No Ct	-	-	-
Ganglion	18,5	No Ct	No Ct	-	-
Rate	18,8	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct
Sang	-	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct
nombre de porcs	3	3	2	2	

C)		Georgia/2007/1					
		ID Georgia/2007/1	<i>O. erraticus</i> gorgées sur membrane	<i>O. erraticus</i> gorgées sur porc			<i>O. porcinus</i> gorgées sur porc
			5513	5523	5514*		
Amygdales	20,3	No Ct	No Ct	25,5	20	-	-
Ganglion	20,7	No Ct	No Ct	36,9	19,1	-	No Ct
Rate	19,8	No Ct	No Ct	28,3	17,4	-	No Ct
Sang	19	No Ct	No Ct	-	19,1	No Ct	No Ct
nombre de porcs	6	6	1	1	1	2	2

Tableau 24: Tableau des résultats de détection du génome viral dans les organes et le sang du dernier jour des expériences.

A) porcs n'ayant pas reçu de virus ; B) porcs ayant été inoculés avec du virus Ambaton/02 ou mordus par des tiques précédemment gorgées sur du sang qui en contenait ; C) porcs ayant été inoculés avec du virus Georgia/2007/1 ou mordus par des tiques précédemment gorgées sur du sang qui en contenait ; * porc ayant reçu une inoculation de broyat de tiques infectées ; – No data.

IV. Discussion du chapitre 2

A. Infection des tiques

Les essais d'infections réalisés sur membrane artificielle et sur porc virémique ont mis en évidence l'impact de la dose virale dans le succès d'infection des tiques, comme cela a déjà été rapporté par certains auteurs (Plowright *et al.*, 1970b, Ribeiro *et al.*, 2015). De ce fait, le gorgement des tiques sur une haute dose de virus dans le sang infectieux semble encore une fois être un des facteurs les plus importants du succès d'infection.

Cependant, le gorgement artificiel peut créer une différence d'appétence pour les tiques, qui pourrait jouer sur le succès de gorgement (moins de tiques gorgées sur une même période de temps) que sur le succès d'infection. Toutefois, cela pourrait aussi jouer sur la réplétion des tiques suite au gorgement et donc sur la quantité de virus ingérée ; cette hypothèse ne peut être vérifiée car seul le poids des tiques gorgées sur membrane a été mesuré. En outre, le fait que dans la méthode de gorgement artificiel, le sang et le virus n'aient pas été naturellement en contact pourrait influencer le succès d'infection. Les souches virales utilisées dans ces études expérimentales sont hémadsorbantes. L'interaction entre le virus et les globules rouges lors du développement de l'infection chez le porc est probablement différente de celle réalisée lors de l'ajout de virus dans le sang de gorgement quelques heures avant l'infection. L'étude de Rowlands (Rowlands *et al.*, 2009) montre que des globules rouges ayant été traités par sonication perdent une partie de leur affinité pour le CD2v. Or, cette protéine est essentielle au virus pour assurer son hémadsorbance avec les globules rouges (Ruiz-Gonzalvo *et al.*, 1996). Ainsi, (Rowlands *et al.*, 2009) montre aussi que lorsque l'affinité entre le virus et les globules rouges n'est plus optimale, l'infection des tiques est alors moins efficace.

En plus de ce problème potentiel de présentation du virus lors du gorgement, la difficulté d'infection des tiques peut aussi provenir de la souche virale elle-même. En effet, le séquençage de la souche géorgienne sur l'ORF EP 402R codant le CD2v montre que cette séquence est très proche de la souche virale malawi Lil20/1 (King *et al.*, 2011), or cette souche virale est connue pour ne pas infecter les tiques *O. porcinus* expérimentalement, même si ces dernières sont exposées à un fort titre viral de $10^{7,3}$ HAD₅₀/ml de sang (Kleiboeker *et al.*, 1999). La présence de la protéine CD2v s'est montrée essentielle dans l'infection des tiques (Nix, 2006), de plus elle a un rôle important dans l'évasion du système immunitaire du porc, puisqu'elle a la propriété d'inhiber la multiplication des LT. Ainsi, lorsque cette protéine est absente, le virus se répand moins bien par l'absence d'association avec les érythrocytes, et la virémie des porcs est moins importante. En outre, le système immunitaire des porcs est plus

facilement capable d'éliminer le virus lorsque la protéine est absente (Borca *et al.*, 1998, Nix, 2006). Ce n'est pas le cas des souches géorgiennes et Ambaton/02, qui présentent toutes les deux une hémadsorption fonctionnelle, donc une protéine CD2v fonctionnelle, lors des isolements viraux sur macrophages alvéolaires. Ces résultats indiquent que même si le CD2v est une protéine importante dans l'infection des tiques, ce n'est sans doute pas le seul facteur à entrer en jeu. Ainsi, même si des virus gardent leur CD2v, une modification n'impliquant par leur pouvoir hémadsorbant pourrait peut-être changer leur faculté à infecter les tiques.

Il s'avère que les espèces de tiques ont aussi une susceptibilité particulière vis-à-vis du virus puisqu'après le gorgement sur porc virémique, seule l'espèce *O. erraticus* présente un taux d'infection de presque 100 %, ainsi qu'un titre viral par tique potentiellement important pouvant atteindre $10^{5.5}$ HAD₅₀/ml de broyat de tique. Le fait que la tique *O. erraticus* soit capable de s'infecter avec la souche Georgia/2007/1, de maintenir le virus vivant mais pas de le transmettre au porc, du moins dans nos conditions expérimentales, soulève la question du franchissement des différentes barrières tissulaires au sein de la tique, notamment la barrière intestinale et celle des glandes salivaires, ainsi que de la capacité du virus à se maintenir dans ces différents organes.

Les résultats de l'espèce *O. porcinus*, dont le succès de gorgement ne fait aucun doute, ont montré qu'elles n'étaient pas capables de s'infecter, ni par la souche Georgia/2007/1, ni par la souche Ambaton/02, que ce soit par gorgement sur membrane artificielle ou sur porc virémique. Le résultat de l'espèce *O. moubata* est moins catégorique. En effet, par gorgement artificiel avec le virus Ambaton/02, du génome viral a été détecté dans quelques tiques (4/53) avec un résultat suffisant pour que la tique puisse être considérée comme infectée. Cependant, ces résultats sont justes inférieurs au seuil de 36 Ct fixé (moyenne de $35,4 \text{ Ct} \pm 0,4$ sur 4 tiques) et peuvent résulter de la faculté des tiques *O. moubata* à prendre un gorgement de sang beaucoup plus conséquent que les deux autres espèces, favorisant ainsi l'effet dose. De plus, le résultat de détection du génome viral, avec un Ct moyen de 26,6 dans 2/20 tiques, après plus de 300 jours indique que cette espèce est capable de s'infecter, dans une faible proportion par la souche virale Ambaton/02. En revanche, aucun résultat concernant les essais d'infection avec la souche virale Georgia/2007/1 ne montre une telle possibilité. Cependant, les résultats de détection observés dans les tiques *O. porcinus* et *O. moubata* après gorgement sur porc sont à relativiser. En effet, le nombre de tiques utilisables pour l'infection sur porc, puis pour l'essai de transmission, était faible. De plus, l'éthique et le coût des expériences d'infection sur porcs ont rendu ces échantillons très précieux. Ces tiques ont donc été conservées pour une potentielle utilisation ultérieure. Certaines sont mortes

naturellement, les autres ont été congelées plus d'un an après l'essai. Ainsi, une disparition naturelle du virus observable dans d'autres publications a pu se produire (Endris & Hess, 1992, Plowright *et al.*, 1970b).

L'absence d'infection peut aussi provenir des colonies de tiques que nous avons utilisées. En effet, à l'égard de la colonie de tiques *O. turicata* utilisée par (Hess *et al.*, 1987) qui ne s'infecte pas, probablement à cause de l'âge de la colonie (25 ans) contrairement à une colonie plus jeune (5 ans), notre colonie de *O. moubata* est vieille d'au moins 40 ans. Il est possible que les sélections réalisées au cours du temps aient fait perdre aux tiques leur capacité à s'infecter. Cependant, un très faible pourcentage de ces tiques présente quand même des résultats de détection d'ADN viral de PPA correspondant à une infection. En ce qui concerne la colonie de tiques *O. porcinus*, la pré-sélection d'individus sains pour démarrer un élevage de tiques non infectées au laboratoire du Cirad a peut-être indirectement sélectionnée des individus non compétents pour le virus. Ceci pourrait expliquer que les résultats de ces tiques soient systématiquement inférieurs, voir négatifs par rapport aux autres espèces.

Au final, une dernière hypothèse est que ces tiques ne sont peut être pas compétentes pour ces deux souches virales extrêmement proches. En effet, les essais d'infection réalisés par (de Carvalho Ferreira *et al.*, 2014) dans les colonies d'*O. moubata* infectées par gorgement artificiel avec la souche Georgia/2007/1 montre un déclin rapide de cette dernière à moins de 10 TCID₅₀/tique sur 49 jours. Sachant la proximité phylogénétique qui existe entre *O. moubata* et *O. porcinus* qui appartiennent toutes deux au même complexe d'espèces, les résultats relativement similaires semblent cohérents. Cependant, la découverte de génome viral dans les tiques *O. porcinus* à Madagascar dans une zone géographique proche de celle où la souche virale Ambaton/02 a été échantillonnée montre que ces tiques en conditions naturelles sont capables de s'infecter (Ravaomanana *et al.*, 2011). Il est donc possible que dans des conditions naturelles, avec des repas de sang infecté probablement répétés dans le temps, les tiques des espèces *O. porcinus* et *O. moubata* soient en mesure de s'infecter par la souche Ambaton/02, mais aussi par la souche Georgia/2007/1.

B. Transmission vectorielle au porc

Tous les essais de transmission entrepris avec *O. erraticus*, *O. porcinus* et *O. moubata* infectées par gorgement artificiel ou par gorgement sur porc virémique ont échoué. Ces résultats sont tout à fait logiques en ce qui concerne les espèces *O. moubata* et *O. porcinus* puisque ces tiques se sont révélées *a posteriori* non infectées, quel que soit le virus et le mode

de gorgement infectieux. Le même constat peut être fait pour *O. erraticus* gorgées artificiellement sur sang infecté avec la souche Georgia/2007/1.

En revanche, les tiques *O. erraticus* gorgées sur porc virémiques étaient bien infectées par la souche Georgia/2007/1 mais n'ont pas réussi à transmettre du virus au porc. Aucun des porcs n'a développé de signes cliniques, la recherche du virus dans le sang et les organes n'a pas non plus mis en évidence la présence de virus, même à un faible niveau. Malgré tout, la présence d'ADN viral a été détectée sur les moustiquaires après l'essai de transmission du virus au porc par ces tiques. Il n'est pas possible de savoir si le virus provenait d'excrétion de fèces ou de sécrétion de liquide coxal. En effet, le mélange de poussière, de transpiration du porc, de sécrétion de liquide coxal et de possible excrétion des fèces lors de la récupération des boîtes de Petri après le gorgement rend impossible cette distinction. Ainsi, si la transmission par la salive ne semble pas effective, la sécrétion par le liquide coxal ou les fèces n'est pas à exclure.

Pour expliquer ces résultats d'infection et de non transmission, la récente étude de (Franz *et al.*, 2015) réalisée chez les moustiques permet de mettre en lumière les différentes barrières anatomiques, notamment la barrière intestinale et la barrière des glandes salivaires, que doit franchir un virus avant de pouvoir être transmis lors de repas de sang. Il est ainsi possible de concevoir que nos tiques *O. erraticus* sont capables de s'infecter par la souche virale Georgia/2007/1, mais que le virus n'a pas la possibilité d'infecter les glandes salivaires, de sorte que la transmission ne peut être réalisée par la suite. C'est tout au moins ce que l'on observe, dans nos conditions expérimentales.

Une autre hypothèse prend le penchant inverse, c'est-à-dire que le virus serait tout de même transmis par les tiques à travers la salive, mais en si petite quantité que l'immunité du porc serait capable de le métaboliser et de l'éliminer avant qu'il n'arrive à infecter les porcs. Cette hypothèse reste toutefois peu probable au regard de nos choix expérimentaux et de nos résultats. En premier lieu, plusieurs études montrent qu'une dose de 10^2 HAD₅₀/porc est suffisante pour déclencher la maladie (McVicar, 1984, Bernard *et al.*, 2015). Or nous avons posé sur chacun des deux porcs environ 30 tiques infectées. Il aurait fallu qu'elles sécrètent chacune moins de 3 particules virales pour être en deçà de 10^2 HAD₅₀/porc. Aucune étude sur la quantité de salive excrétée par les tiques *O. erraticus* n'a été faite, mais celles sur *O. moubata* et *O. porcinus* indiquent qu'elles peuvent excréter individuellement au moins 10^2 HAD₅₀ (Kleiboeker *et al.*, 1998, Plowright, 1977). De plus, l'étude de (Endris & Hess, 1992) montre que 14 tiques *O. erraticus* infectées par la souche de virus Portugal/86 sont capables de transmettre ce virus au porc après 387 jours. Enfin, l'une des dernières raisons qui rend cette hypothèse peu probable est la virulence de la souche Georgia/2007/1 que nous avons utilisée. Une faible dose d'inoculum (10^2 HAD₅₀/porc) ne fait que retarder la maladie de

quelques jours (Bernard *et al.*, 2015), mais le déclenchement des symptômes reste rapide, en moins d'une semaine, et la pathogénie de la maladie reste la même qu'avec un inoculum de 10^4 HAD₅₀/porc.

Une troisième hypothèse serait que la transmission du virus par les tiques infectées a été testée trop tardivement, 5 mois après le gorgement infectieux. La cinétique d'infection des tiques montre que le virus est capable de se généraliser en 6 à 8 semaines (Kleiboeker *et al.*, 1998, Greig, 1972b). Même si les études sur *O. moubata* (Plowright *et al.*, 1970b) et d'autres couples (Tableau 8 du chapitre 1) ont montré que la transmission peut se produire sur une longue période de temps, nous avons vu que les résultats observés pour un couple ne sont pas forcément valables dans les mêmes conditions pour un autre couple. Ainsi, serait-il possible que la transmission ne puisse se faire que sur une période de temps assez restreinte avant que les phénomènes de disparition apparaissent, ce qui ne semblait pas être le cas lors de notre essai de transmission vu les titres viraux retrouvés dans les tiques

C. Limites et perspectives

L'une des plus importantes limites de ces expériences est la méthode de détection du virus dans les tiques. Les tissus de tiques sont maintenant connus pour provoquer une inhibition dans le processus de détection du génome viral par PCR, et dans la détection du virus vivant par isolement viral sur culture de macrophages alvéolaires porcins (Margam *et al.*, 2010, Oura *et al.*, 2013). Cependant, la question de ce travail a été de savoir si les tiques peuvent s'infecter avec une souche virale de génotype II et dans quelles conditions. Ainsi, même si la détection du génome viral est sous-évaluée, cela ne changera pas le statut infectieux ou non infectieux de nos tiques puisque la différence entre les tiques infectées *O. erraticus* gorgées sur porcs virémiques et les autres tiques ne laisse aucun doute sur l'interprétation des résultats (Figure 26). Pour affiner les prochains résultats de quantification qui pourraient être faits, des mises au point d'extraction virale (génome ou particules vivantes) peuvent encore être réalisées. Ainsi, une extraction de virus par billes magnétiques semble être une approche prometteuse au vu des résultats du rapport de stage de Caroline Fano (Fano, 2015).

Le second point peut être l'absence de témoins positifs de tiques infectées par du virus, c'est-à-dire de tiques présentant une compétence vectorielle complète et durable. L'utilisation des couples *O. erraticus*–Portugal/86, *O. moubata*–Liv/13/33 ou *O. porcinus*–Kwh/12 aurait pu, d'après la littérature, convenir. Cependant, leur intégration dans l'expérience aurait nécessité un supplément de tiques adultes, leur nombre étant déjà assez restreint vis-à-vis des expériences prévues. De plus, début 2012, lorsque ces expériences ont

été planifiées, rien dans la littérature ne nous permettait de penser que les infections avec *O. moubata* et *O. porcinus*, connues pour être des vecteurs confirmés de virus de la PPA, seraient un échec.

Malgré tous, nos résultats restent très intéressants. Nous avons réussi à infecter l'espèce *O. erraticus* par la souche virale Georgia/2007/1, ce qui confirme l'étude réalisée par (Diaz *et al.*, 2012). Cependant, nous n'avons pas réussi à infecter nos tiques par gorgement artificiel comme ce qui avait été fait dans leur étude. La principale différence méthodologique entre nos deux études est l'ajout d'antibiotiques et d'antifongiques (streptomycine, amphotéricine B et néomycine) dans le sang de gorgement infectieux dans l'expérience de (Diaz *et al.*, 2012). Hors, comme nous l'avons vu au chapitre 1, la composition du microbiome peut influencer le succès d'infection des vecteurs (Hegde *et al.*, 2015, Jupatanakul *et al.*, 2014, Dale & Welburn, 2001). Toutefois, comparées à leur étude, nos expérimentations vont plus loin, par l'évaluation de l'étape de transmission au porc. Même si l'échec de la transmission du virus au porc par des tiques infectées a été observé, nos résultats de détection de génome viral sur les moustiquaires nous ouvrent plus de questions encore.

Nos résultats ont aussi montré que l'infection des tiques n'est pas, comme la littérature le suggère de prime abord, si facile et systématique. Ainsi, en parallèle de ce qui a été évalué dans la synthèse bibliographique du chapitre 1, ces expériences montrent encore une fois que la compétence vectorielle est fonction du couple tique-virus. Elle nécessite aussi dans un contexte expérimental de laboratoire, et pour l'évaluation d'un nouveau couple jamais retrouvé naturellement, des conditions favorables se rapprochant de ce qui passerait probablement dans la nature. Bien sûr, à l'instar du couple *O. puertoricensis*-souche virale DR11, un couple n'ayant pas non plus été retrouvé dans la nature mais dont la tique est capable de s'infecter et de transmettre le virus (Endris & Hess, 1992, Endris *et al.*, 1991, Hess *et al.*, 1987), les succès d'infection et de compétence ne reposent bien évidemment pas que sur des conditions optimales d'évaluation en laboratoire. Cependant, si de bonnes conditions de laboratoire permettent de réussir l'infection pour des couples jamais encore observés, quand serait-il dans la nature, s'ils avaient la possibilité de se rencontrer ? Est-ce que le nombre de tiques infectées, tous stades confondus, d'une population naturelle serait en mesure d'influencer le succès de transmission du virus au porc ? Est-ce que la fréquence des repas de sang des tiques infectées que subissent les porcs aurait une influence sur le succès de transmission du virus par les tiques ? Il est tout à fait vraisemblable que dans la nature, toutes les tiques ne se gorgent pas en même temps et que les porcs soient sujets à plusieurs spoliations sanguines sur des plages de temps assez courtes.

Le gorgement des tiques est, comme nous venons de le voir à plus d'un titre, une étape clé de la compétence, que ce soit pour l'infection de la tique ou pour la transmission du virus au porc. Sur cette étape, les tiques *Ornithodoros* sont d'ailleurs assez particulières et, à l'instar des autres vecteurs hématophages (moustiques ou tiques dures), elles se sont adaptées au fil du temps à leur environnement et présentent aujourd'hui à travers leur salive un arsenal pharmacologique impressionnant. La salive et son pouvoir immunomodulateur fait d'ailleurs partie des facteurs intrinsèques à l'espèce de tiques pouvant influencer la compétence vectorielle et sera le sujet du chapitre suivant.

Chapitre 3 : Rôle de la salive de tique *Ornithodoros* dans la transmission d'un virus de génotype II au porc.

Comme nous venons de le voir, l'étape d'infection de la compétence vectorielle ne semble pas systématique dans notre modèle d'étude et nécessite des conditions favorables pour être atteinte. Cependant, la donnée la plus utile pour les modèles d'évaluation du risque et qui conditionne le succès de compétence reste avant tout l'étape de transmission. Plusieurs facteurs intrinsèques aux tiques peuvent l'influencer, notamment le choix de l'espèce étudiée et du statut de la colonie, comme nous l'avons discuté au chapitre 2. Cependant, un autre facteur important peut aussi entrer en jeu dans cette étape de transmission, la salive de la tique. L'effet de la salive de tique, notamment face à la réponse du système immunitaire du porc lors du gorgement peut être déterminant sur le succès de transmission. En effet, la salive des arthropodes hématophages est connue depuis de nombreuses années pour jouer un rôle essentiel sur le succès du repas de sang chez leurs hôtes. C'est d'ailleurs grâce à cette formidable pharmacopée contenue dans la salive que l'on ne ressent pas la morsure des tiques, parfois même avant plusieurs jours.

L'objectif de ce dernier chapitre sera donc consacré à l'étude de l'influence de la salive de tique sur l'infection par le virus de la PPA chez le porc et sur le recrutement des cellules immunitaires sur le lieu de morsure à 1 h et à 48 h pi. Ce chapitre est divisé en deux parties. La première est consacrée à une synthèse bibliographique pour mieux comprendre comment fonctionne le système immunitaire des hôtes vertébrés face à l'influence remarquable de la salive des arthropodes hématophages. La seconde partie décrit les travaux expérimentaux réalisés dans le cadre de cette thèse et publiés sous le titre « Effect of *O. porcinus* tick salivary gland extract on the African swine fever virus infection in domestic pig », dans la revue PlosONE (Bernard et al, 2016) (Annexe n°7).

I. Synthèse bibliographique

A. La salive des arthropodes hématophages, un puissant immunomodulateur.

En raison de leur mode d'alimentation, tous les grands groupes d'arthropodes hématophages (culicoïdes, glossines, moustiques, puces, réduves, simules, taons, tiques...) sont connus pour être des vecteurs de parasites (Combes, 1995). Les études menées sur la composition de la salive (sialome) de la plupart de ces groupes ont révélé la présence de puissantes molécules immunomodulatrices, retrouvées soit de manière ubiquitaire, soit de manière spécifique (Francischetti *et al.*, 2009, Titus *et al.*, 2006, Gillespie *et al.*, 2000, Ribeiro & Francischetti, 2003).

La fonction principale de ces molécules salivaires est d'assurer le bon déroulement du repas sanguin vis-à-vis de la réponse immunitaire précoce déployée par l'hôte prélevé. Le mode de gorgement des tiques *Ixodidae* (tique dure) ou *Argasidae* (tique molle) les contraint à rester pendant une assez longue durée sur leur hôte jusqu'à réplétion, de quelques heures pour les *Argasidae* à plus d'une dizaine de jours pour certaines espèces d'*Ixodidae*. C'est probablement pourquoi elles possèdent une plus large gamme de molécules immunomodulatrices dans leur sialome que la plupart des autres arthropodes.

1. Aperçu de la première étape de la réponse de l'hôte vertébré face à une blessure : l'hémostase.

Lorsque les parties buccales de l'arthropode hématophage perforent la peau de son hôte, le premier rempart que déploie l'hôte est le système hémostatique (Figure 28). L'hémostase est un mécanisme qui permet de prévenir la perte de sang suite à une blessure. Son rôle est de réguler la vasoconstriction, l'agrégation des plaquettes et la cascade de coagulation sanguine (Ribeiro & Francischetti, 2003, Champagne, 1994, Shaw & Martin, 2009). Une vasoconstriction des vaisseaux perforés va circonscrire l'hémorragie, alors qu'une vasodilatation a lieu dans les tissus proches de la blessure, accentuant la perméabilité de l'épithélium vasculaire sain au recrutement des cellules immunitaires. La production de vasoconstricteurs va activer dans un second temps les plaquettes dont le rôle majeur est de colmater les blessures : un clou plaquettaire va se former à l'endroit de la blessure. Cette matrice provisoire, sur laquelle des facteurs de croissances se lieront, facilitera le déplacement des cellules de la réparation tissulaire et de la coagulation. L'activation des plaquettes déclenche aussi la dernière phase de l'hémostase : la coagulation (décrite plus détails en

Annexe 6A). Le sang coagulé se retrouvera aussi dans un bain de sérum contenant plusieurs molécules immunitaires comme des interleukines (IL), des cytokines (TNF- α et interféron- γ (IFN)) et des facteurs de réponse de sérum (Palta *et al.*, 2014, Fontaine *et al.*, 2011).

En réponse à ce phénomène, plusieurs types de molécules, présenté ici de manière non exhaustive sont retrouvés dans la salive des tiques :

i) Des vasodilatateurs vont permettre d'augmenter le diamètre des vaisseaux sanguins de l'hôte. Le débit de sang ainsi accentué permettra non seulement d'éviter l'hémostase, mais également de réduire le temps de gorgement nécessaire à l'obtention d'un repas complet. Les molécules sont de nature assez diverse. Chez les tiques dures, les vasodilatateurs sont surtout des composés de dérivés lipidiques de type prostacycline et prostaglandine (Francischetti *et al.*, 2009, Anderson & Valenzuela, 2008). Les molécules vasodilatatrices ne sont pas encore connues chez les tiques molles. Cependant, les recherches sur la salive d'*O. parkeri* ont permis d'identifier une molécule homologue à l'adrénoméduline qui possède des propriétés vasodilatatrices chez les vertébrés (Francischetti *et al.*, 2008).

ii) Des molécules antiplaquettaires et anticoagulantes, qui sont principalement des enzymes de type apyrase (Ribeiro *et al.*, 1991, Ribeiro *et al.*, 1985) et des peptides anticoagulants qui inhibent le facteur Xa (FXa). Les autres molécules sont des antagonistes des thrombines et du collagène, et des molécules à domaine Kunitz. Chez *O. moubata* ou *O. savignyi*, les molécules ornithodorine, moubatine, mougrine et savignine ont été identifiées comme jouant ce rôle (Francischetti *et al.*, 2009, Anderson & Valenzuela, 2008, Keller *et al.*, 1993, Nienaber *et al.*, 1999, Fontaine *et al.*, 2011, van de Locht *et al.*, 1996). Une étude récente sur la salive d'*O. moubata* vient de montrer que cette espèce possède aussi d'autres molécules, tel que Om44, dont les fonctions ne sont pas encore totalement connues, mais qui sont impliquées dans les réponses anti-hémostatiques et anti-inflammatoires (Diaz-Martin *et al.*, 2015).

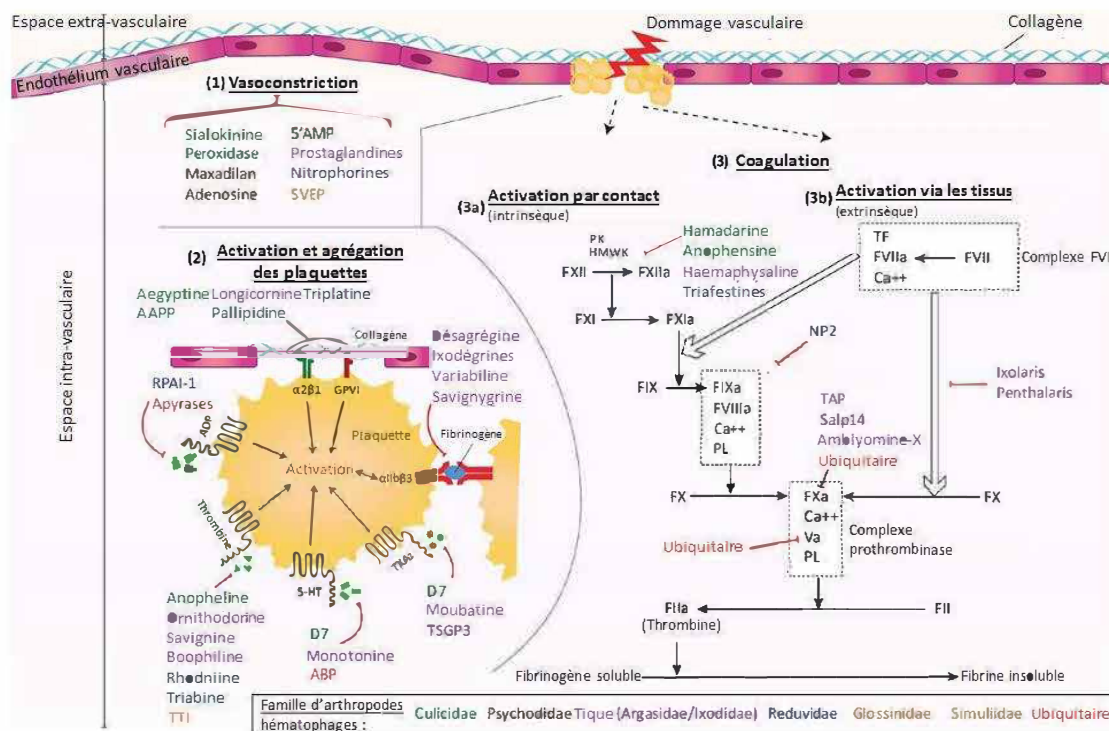


Figure 28 : Schéma de l'action des molécules de la salive de plusieurs familles d'arthropodes hématophages lors de l'hémostase.

Chaque famille d'arthropodes est représentée par une couleur, la catégorie « Ubiquitaire » signifie que le mécanisme est commun à toutes les familles d'arthropodes citées. Après avoir subi une blessure par piqûre lors du repas sanguin, la vasoconstriction (1) est la première réponse que l'hôte met en place pour diminuer la perte de sang et améliorer l'adhésion des plaquettes (2). L'agrégation des plaquettes est la seconde étape. Elle est activée par des agonistes des plaquettes (Adénosine diphosphate (ADP), Thrombine, Thromboxane A2 (TXA2), sérotonine (5-HT)) et par des récepteurs membranaires des plaquettes liés à un fibrinogène, pour initier la formation du clou plaquettaire. Enfin la cascade de coagulation (3) va renforcer la formation du clou plaquettaire par l'ajout de fibrines. Elle s'active par deux voies, une voie intrinsèque par contact, initiée par des protéines de type kininogène (HMWK), prékallikréine (PK), facteur XII, facteur XI et facteur IX (3a), puis une voie extrinsèque grâce à des facteurs tissulaires et le complexe de facteur VII (3b). Toutes deux mènent à l'activation du facteur X qui va cliver la prothrombine en thrombine permettant ainsi la production de fibrines insolubles à partir de fibrinogènes solubles. (Fontaine *et al.*, 2011).

2. Aperçu de la seconde étape de la réponse de l'hôte vertébré face à une blessure : inflammation et système immunitaire inné

L'inflammation est la seconde ligne de défense des organismes lors d'une blessure. Elle crée un lien entre l'hémostase et la réponse immunitaire innée puisqu'elle va moduler une partie de l'hémostase, conduire à la réparation cellulaire, et permettre l'installation de la réponse innée lors de l'introduction d'un antigène étranger. Le premier signe de l'inflammation est l'apparition de rougeur et de chaleur autour de la blessure, induites par la vasodilatation des vaisseaux sanguins. La vasodilatation des vaisseaux non lésés va entraîner une augmentation de la perméabilité vasculaire permettant le passage des effecteurs de l'immunité sur le site de la blessure. Les autres signes classiques de l'inflammation sont la formation d'œdèmes et l'apparition de la douleur (Francischetti *et al.*, 2009, Owen *et al.*, 2014). Les molécules à l'origine de ces symptômes (histamine, adénosine et bradykinines) sont principalement sécrétées par des mastocytes et des basophiles, ou par les plaquettes. L'histamine est un puissant médiateur et facteur vaso-actif impliqué dans la formation d'œdèmes et d'érythèmes (lésion inflammatoire cutanée) : elle entraîne le recrutement de cellules immunitaires par la dilatation et l'augmentation de la perméabilité vasculaire lors de la réponse immune précoce. Elle intervient ensuite dans la régulation de la réponse des cellules T et l'activation des cellules NK (Takeshita *et al.*, 2003). L'adénosine peut avoir des propriétés pro-nociceptives lorsqu'elle active le récepteur A₃ des mastocytes, libérant ainsi de l'histamine et induisant la douleur. Les bradykinines sont, quant à elles, impliquées dans la perception de la douleur et dans la formation d'œdèmes (Francischetti *et al.*, 2009, Anderson & Valenzuela, 2008, Fontaine *et al.*, 2011, Sawynok, 1998).

La réponse immune innée de type humoral se met en place très rapidement dans les minutes et les heures qui suivent l'apparition de la lésion, par l'activation du système du complément (décrit plus en détails en Annexe 6B), la sécrétion de peptides et de protéines antimicrobiennes et le recrutement d'anticorps lorsque la réponse a déjà été activée une première fois (Figure 28) (Owen *et al.*, 2013).

L'autre facette de la réponse immune innée, de type cellulaire, débute suite à l'introduction d'antigènes étrangers dans l'organisme. Son activation est provoquée par des récepteurs de reconnaissance des signatures (PRR : Pattern Recognition Receptors). Les PRR se trouvent à la surface des cellules immunitaires, et s'activent par un fonctionnement de type clé-serrure lorsqu'ils rencontrent les motifs moléculaires associés aux parasites (PAMP, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*), (Owen *et al.*, 2013, Kupper & Fuhlbrigge, 2004). La

famille la plus connue de PRR est celle des récepteurs de type Toll (TLR = *Toll Like Receptors*) à la fois présents chez les vertébrés et les invertébrés (Owen *et al.*, 2013, Schmid-Hempel, 2011, Kupper & Fuhlbrigge, 2004). Il existe une très grande variété de TLR pouvant reconnaître plusieurs types de ligands sur les parasites (exemple : peptidoglycanes des bactéries gram +, ARN double et simple brin de virus, des mannanes de champignon ou encore des phosphatidylsérines de schistosomes) (Owen *et al.*, 2013). Une fois activées, les cellules vont sécréter des molécules solubles d'adressage de type cytokines et chimiokines, leur permettant de communiquer. Elles vont commencer à coordonner la destruction des parasites grâce à un recrutement massif de nouvelles cellules immunitaires, intensifier la réponse immunitaire et alerter le système immunitaire adaptatif de l'infection en cours.

De nombreuses interactions entre les cellules de l'épiderme et du derme se mettent ainsi en place, lors d'une blessure, faisant intervenir des cellules endothéliales, des plaquettes ou encore des leucocytes (Figure 29).

Les premières cellules immunitaires auxquelles est confronté l'arthropode hématophage sont les cellules de Langerhans (LC), situées le long de l'épiderme (couche externe fine de la peau non vascularisée). Ce sont des cellules sentinelles, sous-catégorie de cellules dendritiques (DC), qui ont un rayon d'action limité aux couches supérieures de la peau. Elles ont pour rôle de détecter et de présenter les antigènes étrangers aux LT dans les ganglions lymphatiques drainant les plus proches (Merad *et al.*, 2008). Plus profondément dans le derme, on retrouve éparpillés des leucocytes myéloïdes résidents tels des cellules dendritiques (rôle de cellule présentatrice d'antigène (CPA)), des macrophages (rôle principal de phagocytes et secondaire de CPA), des mastocytes (rôle dans l'activation de l'inflammation et de l'immunité innée) et des cellules NK (seule lignée de cellules lymphoïdes à intervenir dans l'immunité innée en libérant des granules sécrétoires cytotoxiques) (Kupper & Fuhlbrigge, 2004). Des cellules résidentes telles que les fibroblastes et les kératinocytes ont aussi un rôle à jouer lors de la réparation tissulaire et la réponse à une infection (Bernard, *et al.*, 2014, Nestle *et al.*, 2009).

Lorsque ces cellules immunitaires de la peau sont activées, elles déclenchent le recrutement massif de nouvelles cellules immunitaires sur le lieu de la lésion grâce à la sécrétion des nombreux médiateurs pro-inflammatoires et facteurs chimiotactiques, comme l'IL-1, IL-6, TNF- α , ou encore la protéine d'inflammation des macrophages 1 α (MIP-1 α).

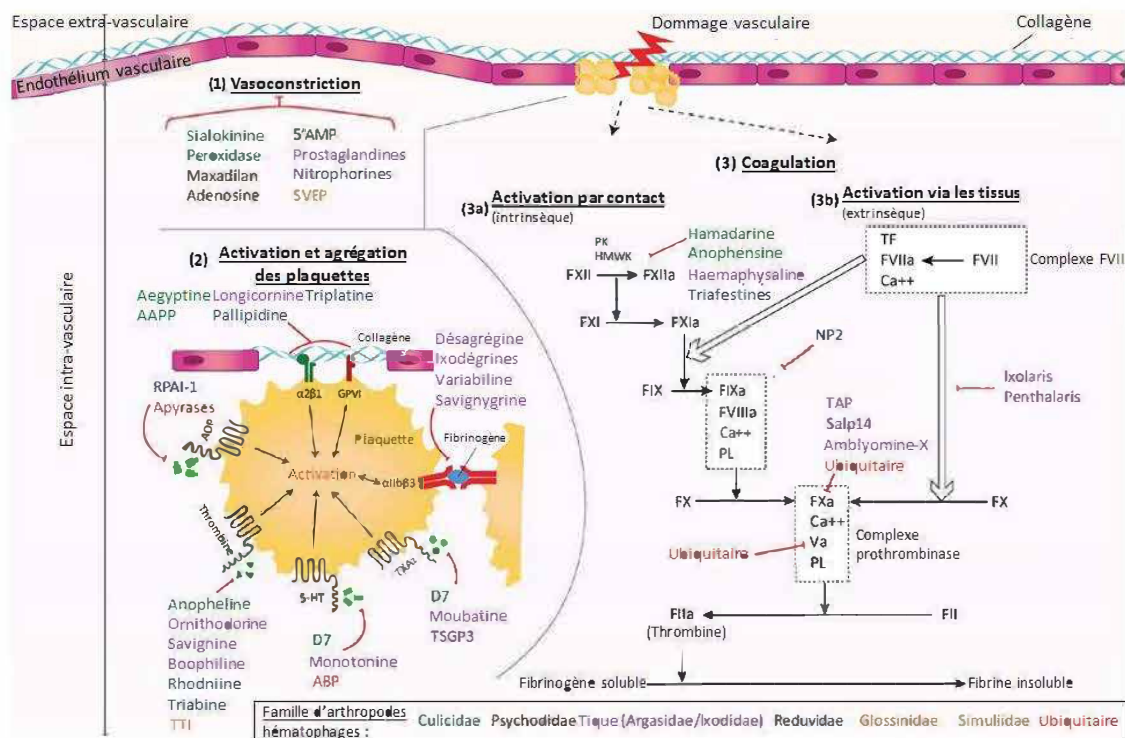


Figure 29 : Schéma de l'action des molécules de la salive de plusieurs familles d'arthropodes hématophages lors de la modulation de l'immunité innée et adaptative.

Chacune est représentée par une couleur, la catégorie « Ubiquitaire » signifie que le mécanisme est commun à toutes les familles d'arthropodes citées. Les cellules impliquées dans la réponse innée (neutrophiles, cellules natural killers (NK), mastocytes et macrophages (Mφ)) représentent la 1^{re} ligne de défense d'un organisme. Quand elles sont activées, elles sécrètent des molécules (MIP-1α, TNF-α, interleukines ou leucotriènes) qui initient les processus d'inflammation et déclenchent l'activation du système complément. Les cellules endothéliales et les plaquettes vont activer les facteurs de coagulation qui, par une cascade de réaction via les récepteurs PARs, mènent à la surexpression de molécules de surface adhésives (ICAMs, E-selectin, P-selectin) et à la migration des neutrophiles sur le site de lésion. Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) dont les acteurs principaux sont les cellules dendritiques (DC) vont alors migrer vers les ganglions lymphatiques. Ils vont interagir avec les lymphocytes T CD4⁺ helper (Th0) via leurs récepteurs TCR ou le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II (glycoprotéine transmembranaire fondamentale lors la présentation des antigènes par les CPA aux lymphocytes T). Les cellules Th0 se différencient ensuite en Th1 et Th2, puis en cellules mémoires Th M qui amélioreront la qualité et la rapidité de la réponse immune lors d'une prochaine reconnaissance des mêmes antigènes. Elles interagissent aussi avec les lymphocytes B (B cell) pour induire la production d'anticorps. Ces derniers permettront une meilleure reconnaissance des antigènes étrangers, augmentant la réponse du système du complément et le recrutement des cellules immunitaires. D'après (Fontaine *et al.*, 2011, Andrade *et al.*, 2005).

La première vague de recrutement contient principalement des leucocytes. Les monocytes, cellules immatures myéloïdes à l'origine de la formation des macrophages et des DC arrivent très rapidement. Les polynucléaires neutrophiles sont aussi retrouvés. Ces cellules ont un rôle de phagocytose et de sécrétion de granules pharmacologiquement actifs : protéases, protéines antimicrobiennes ou encore histamines. D'autres granulocytes, principalement des basophiles et des éosinophiles, rejoignent aussi rapidement le lieu de blessure. Les basophiles possèdent des granules (cytokines, histamine) qui permettent surtout d'augmenter la perméabilité des vaisseaux sanguins. Les éosinophiles contiennent des granules avec une plus grande variété de fonctions : vasodilatation, activité antivirale, dégranulation des basophiles, modulation de la réponse adaptative ou encore recrutement des leucocytes...). Enfin, des cellules NK sont également souvent observées dans cette première vague de recrutement (Shaw & Martin, 2009, Owen *et al.*, 2013, Francischetti *et al.*, 2009).

La seconde vague de recrutement des cellules immunitaires se déclenche 3 à 4 jours après le premier contact, c'est la réponse immune adaptative (Figure 29). Elle est cependant plus rapide lorsque le système immunitaire de l'hôte a déjà rencontré les corps étrangers qu'il combat.

L'arrivée de cette seconde vague de cellules est déclenchée par la reconnaissance d'un antigène étranger par des CPA. Les CPA vont alors migrer, via les vaisseaux lymphatiques afférents, vers les ganglions drainants les plus proches pour présenter aux lymphocytes naïfs les antigènes étrangers (Figure 30). La présentation se fait aux LT matures, à des LT CD8⁺ (surtout des LT cytotoxiques) et à des LT CD4⁺ (principalement des LT auxiliaires ou *helper*), puis aux lymphocytes B (LB). Une fois activés, ces lymphocytes vont commencer une nouvelle phase de maturation et une phase de division cellulaire. Les LB vont migrer vers les différents organes de production d'anticorps (ganglion, moelle osseuse et tissus lymphoïdes) et se transformer en plasmocytes (cellules hautement spécialisées dans la sécrétion d'anticorps). Quatre fonctions principales sont attribuées aux anticorps. Ils permettent de neutraliser des virus et des toxines en masquant leurs récepteurs. Lorsque les anticorps détectent un antigène, ils forment un complexe anticorps-antigène. Ce dernier va permettre d'activer l'opsonisation des corps étrangers par des macrophages. Il aide aussi à la fixation du système du complément sur les corps étrangers, ce qui induira leur lyse ou leur phagocytose. De plus, le complexe anticorps-antigène va augmenter la reconnaissance des corps étrangers par des cellules NK et des granulocytes, activant leur activité cytotoxique et l'apoptose des cellules cibles. Les LT vont quant à eux migrer vers le site d'infection. Ils vont ainsi permettre de réguler et de diriger de manière plus ciblée la réponse immune en fonction des antigènes rencontrés,

grâce à la sécrétion de différentes combinaisons de cytokines (Figure 31). (Owen *et al.*, 2013, Schmid-Hempel, 2011).

Face à cet arsenal, les tiques ont donc dû développer des molécules salivaires extrêmement diversifiées leur permettant à la fois de réduire l'inflammation et de moduler l'immunité de leurs hôtes (Figure 28) (Andrade *et al.*, 2005, Brossard & Wikel, 2004, Hovius *et al.*, 2008, Fontaine *et al.*, 2011). Il existe de très nombreuses molécules qui ont été découvertes, seules quelques unes, ayant plutôt un rôle lors de la réponse innée des hôtes vertébrés, sont présentées ici de manière à illustrer leur diversité de composition et d'action. Sur le plan inflammatoire, des molécules ayant des propriétés antihistaminiques et anti-sérotoniques sont retrouvées chez presque tous les arthropodes ainsi que chez *O. parkeri*. Des enzymes de type adénosine désaminase ou possédant des activités kininase sont aussi très communes puisqu'elles permettent de dégrader l'adénosine et les bradykinines retrouvées sur les sites de gorgement (Francischetti *et al.*, 2009).

L'autre grand groupe de molécules salivaires possède des activités anti-complément. . Chez les tiques, *Ixodes scapularis* possède des protéines Isac qui peuvent inhiber la formation de la C3 convertase et agir sur la cascade de régulation du complément (Valenzuela *et al.*, 2000). Une protéine majeure a aussi été caractérisée dans la salive d'*O. moubata* : la protéine OmCI décrite comme inhibant l'activation de la protéine C5 du complément (Barratt-Due *et al.*, 2011, Nunn *et al.*, 2005).

Du côté de l'immunité cellulaire, les molécules retrouvées dans le sialome sont souvent en mesure d'inhiber l'activation des cellules ou leur action. En ce qui concerne les tiques dures, que ce soit sur des modèles *in vitro* ou *in vivo* de nombreuses études montrent que d'importantes modulations se mettent en place. Des SGE de plusieurs espèces de tiques, *Ixodes ricinus*, *D. reticulatus*, *Amblyomma variegatum* et *Haemaphysalis inermis*, ont montré une capacité à inhiber l'activité des cellules NK d'origine murine ou humaine *in vitro* (Kopecky & Kuthejlova, 1998, Titus *et al.*, 2006). La molécule sialostatine retrouvée chez *I. scapularis* inhibe quant à elle le recrutement des granulocytes de souris *in vitro* (Kotsyfakis *et al.*, 2006).

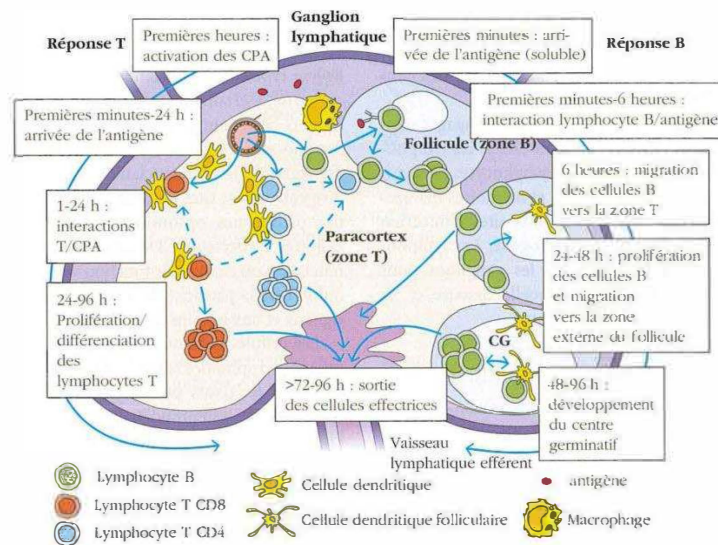


Figure 30 : Schéma du comportement des lymphocytes B et T dans un ganglion lymphatique après introduction d'un antigène.

Les follicules sont les zones où sont retrouvés les LB et le paracortex celle des LT. CG : centre germinatif, où se produit l'activation, la prolifération et la différenciation des LB dans les ganglions ou la rate (Owen *et al.*, 2013).

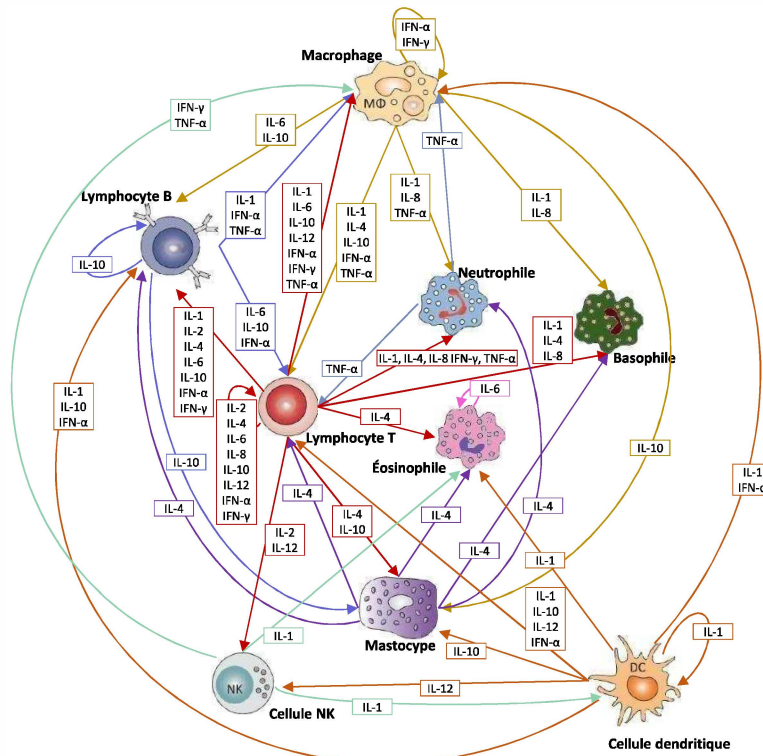


Figure 31 : Schéma non exhaustif représentant le réseau de cytokines évoqué dans ce chapitre contrôlant le système immunitaire.

Chaque couleur correspond aux cytokines produites par un type cellulaire. Modifié d'après (Owen *et al.*, 2013)

Plusieurs études ont également montré une action de la salive sur les macrophages. Ainsi, la salive ou des SGE de *I. ricinus*, *Rhipicephalus sanguineus* et *Amblyomma americanum*, ont été capables d'inhiber le recrutement des macrophages, leur action de phagocytose et leur production de monoxyde d'azote (NO) grâce entre autres à la modulation de cytokines telles que MIP-1 α (Nuttall *et al.*, 2008, Oliveira *et al.*, 2008, Jaworski *et al.*, 2001, Kuthejlova *et al.*, 2001). À l'inverse, la salive d'*Amblyomma* peut aussi augmenter la prolifération des macrophages dans la cavité de gorgement, chez les cochons d'inde (Francischetti *et al.*, 2009).

Les cellules dendritiques sont aussi des cibles préférentielles des molécules de salive. Par exemple, la salive de *Rhipicephalus sanguineus* peut inhiber *in vitro* la différenciation des cellules dendritiques de souris (Cavassani *et al.*, 2005) et celle de *Rhipicephalus appendiculatus* réduire la sécrétion *in vitro* d'IL-6 des cellules dendritiques de mammifères (Preston *et al.*, 2013).

La protection des tiques vis-à-vis de l'immunité innée se concentre principalement sur les LT. Ainsi, la salive d'*I. ricinus* et *I. scapularis* possèdent des molécules inhibitrices de la prolifération des LT et de leur sécrétion d'IL-2 chez les souris *in vitro* (Kotsyfakis *et al.*, 2006, Francischetti *et al.*, 2009).

La salive des tiques molles est moins étudiée dans ce domaine, toutefois des publications portant sur *O. brasiliensis* (Reck *et al.*, 2013) ont montré *in vitro* et *in vivo* que les SGE baissent la viabilité et la prolifération des cellules endothéliales de rat lors de la cicatrisation. Une étude sur les SGE d'*O. moubata* et *O. erraticus* (Astigarraga *et al.*, 1997) suggère que les tiques molles sont capables de prévenir les effets d'un afflux d'éosinophiles, de basophiles, de neutrophiles et de macrophages (induits par l'IL8 et MPC-1). D'autres études se sont plus concentrées sur la composition du sialome de ces tiques. Ainsi, la salive d'*O. parkeri* possède des molécules habituellement impliquées dans la modulation du métabolisme, de la réplication des cellules et du cycle cellulaire et celle d'*O. moubata* et d'*O. porcinus* des molécules impliquées dans le trafic intracellulaire et la sécrétion, la production et la conversion d'énergie (Francischetti *et al.*, 2009).

B. La salive des arthropodes hématophages améliore la transmission des parasites.

Les arthropodes hématophages sont des vecteurs efficaces de parasite puisqu'ils peuvent autant prélever qu'injecter directement les parasites dans le sang de leurs hôtes. Ils permettent ainsi aux parasites de s'affranchir du passage des premières barrières physiques des hôtes. De plus, grâce au pouvoir immunomodulateur précédemment décrit de la salive, les parasites sont inoculés dans un site relativement protégé qu'ils peuvent plus facilement envahir. Les études portant sur la salive des arthropodes hématophages dans une relation tripartite vecteur-hôte-parasite ont révélé que certaines molécules avaient le pouvoir d'augmenter l'infectivité des hôtes et des vecteurs comparée à une inoculation seule du parasite (Wikel, 1999). Ces molécules ont été appelées SAT (Saliva-Assisted ou Activated Transmission) (Nuttall *et al.*, 2008).

Dans une transmission entre tiques, lors du repas de sang, ces molécules sont les principaux acteurs du co-feeding (Nuttall *et al.*, 2008). On peut par exemple citer l'étude de (Gern & Rais 1996) qui a en effet montré que des nymphes *I. ricinus* étaient capables d'être infectées par *B. burgdorferi* lors d'un repas de sang pris à proximité de nymphes infectées sans que la souris ne soit virémique ; ou encore celle de (Nonaka, *et al.* 2010) qui montre l'importance que représente ce mode de transmission dans le maintien du TBE dans les populations de tiques *I. scapularis*. Ce phénomène pourrait être dû aux mouvements des leucocytes recrutés (monocytes-macrophages, cellules dendritiques) entre deux sites de gorgement proches via des molécules chimio-attractives et à une immunodépression au site de gorgement (Randolph, 2011).

Lors de la transmission aux hôtes, des preuves directes et indirectes de la présence de ces molécules SAT dans la salive ont été décrites. Chez les tiques dures, on observe par exemple une amélioration de la transmission de plusieurs espèces de bactéries Borrelies dont *Borrelia afzelii* par *I. ricinus* et *B. gainii* par *Ixodes persulcatus* chez la souris (Pechova *et al.*, 2002, Sato & Nakao, 1997) ou de la bactérie *Francisella tularensis* aussi par *I. ricinus* chez la souris (Zeidner *et al.*, 2002).

Les molécules qui ont été caractérisées comme SAT sont encore peu nombreuses. On retrouve dans la salive des tiques dures, la molécule Salp15, connue pour son implication dans la transmission de *Borrelia burgdorferi*, spirochète responsable de la maladie de Lyme (Ramamoorthi *et al.*, 2005). Elle a le pouvoir d'inhiber l'activation des LT CD4⁺ et peut se lier à la protéine de surface OspC des spirochètes (Anguita *et al.*, 2002, Ramamoorthi *et al.*, 2005).

La bactérie se trouve ainsi protégée des anticorps de l'hôte. Les autres molécules soupçonnées de jouer un rôle de SAT sont les molécules décrites précédemment pour détourner le système immunitaire. Ainsi les anti-histaminiques tout comme les molécules cystatines qui ont un rôle dans la modulation des LTc sont de bons candidats. Des molécules inhibitrices du système du complément pourraient promouvoir la transmission de la borrélie *B. afzelii* (Kyckova & Kopecky, 2006). Par exemple, les SGE de *R. appendiculatus* améliorent considérablement la réplication du virus de la stomatite vésiculaire *in vitro* dans des cellules de souris en modulant la sécrétion des interférons (Hajnicka *et al.*, 1998).

Une seule étude a relevé la présence de ces molécules SAT chez les tiques molles, avec une amélioration de la transmission dans un modèle non naturel, celui du virus du West Nile par les tiques *O. moubata* chez la souris (Lawrie *et al.*, 2004).

Mais l'efficacité de ces molécules serait dépendante du trio étudié, comme le montrent plusieurs exemples : *I. ricinus* améliore la transmission du virus de l'encéphalite à tique, et n'a aucune influence sur la transmission du virus Thogoto chez le cochon d'inde. (Jones *et al.*, 1992, Labuda *et al.*, 1993). Il en est de même avec la bactérie *B. lusitaniae* dont la transmission est améliorée par la co-inoculation de SGE d'*I. ricinus* mais pas par la présence de SGE d'*I. scapularis* chez la souris (Zeidner *et al.*, 2002).

II. Partie expérimentale : Influence de la salive des tiques *O. porcinus* sur l'infection du porc par le virus de la PPA

Comme nous avons pu le voir, la salive des tiques *Ornithodoros* est assez peu étudiée et ne l'a jamais été dans un contexte de transmission de la PPA. En utilisant un modèle naturel de porc domestique, de tiques *O. porcinus* collectées à Madagascar et d'une souche malgache du virus de la PPA l'objectif de ce chapitre est d'étudier l'effet de la salive des tiques dans ce contexte. Ainsi, nous avons voulu évaluer par une expérience préliminaire quelle était l'influence d'un extrait de glandes salivaires d'*O. porcinus* sur l'infection du porc domestique par le virus de la PPA, puis se focaliser sur le recrutement des cellules immunitaires dans la peau de porc au site d'inoculation à 1h pi et 48h pi, avec ou sans co-inoculation intradermique du virus de la PPA. Les macrophages et les cellules de Langerhans ont principalement été ciblés dans cette étude d'une part en raison de leur rôle connu dans la défense de l'organisme et d'autre part comme cellules cibles du virus de la PPA.

En effet, durant la phase précoce de l'infection par le virus de la PPA, les cellules phagocytaires mononucléées sont les cibles principales pour la réplication virale (Gomez-Villamandos *et al.*, 2013). Sur le site d'inoculation, le virus de la PPA induit le recrutement de macrophages, ainsi que leur maturation, et leur activité phagocytaire et sécrétoire (Gomez-Villamandos *et al.*, 2013), grâce à une sur-production de cytokines telles que le TNF- α , l'IL-1 et l'IL-6 (Gomez del moral *et al.*, 1999, Salguero *et al.*, 2002). Les macrophages, comme nous l'avons vu précédemment, ont des fonctions essentielles dans la réponse immune innée de l'hôte, dans la modulation de l'inflammation et la maintenance de l'homéostasie de la peau (Nestle *et al.*, 2009, Shaw & Martin, 2009) lors d'une agression par morsure de tique. D'autres cellules immunitaires sont aussi ciblées par le virus de la PPA pour sa réplication comme par exemple les cellules présentatrices d'antigènes, particulièrement les cellules de Langerhans (LC), qui ont un rôle de sentinelles dans la peau et agissent aussi lors d'une agression par morsure de tique. Ces cellules présentatrices d'antigènes arrivent ensuite à maturité en tant que cellules dendritiques interdigitalisées dans le premier ganglion lymphatique drainant et présentent des antigènes du virus de la PPA et de la salive de tiques aux lymphocytes (Gregg *et al.*, 1995).

Or, en présence de salive de tique, comme nous avons pu le voir dans d'autres modèles tiques, la salive a été décrite comme augmentant l'attraction chimique ou la maturation des macrophages, altérant la fonction des cellules dendritiques (DC) dans le transport des antigènes du non-soi et réduisant la capacité des lymphocytes à proliférer (Francischetti *et al.*,

2009, Titus *et al.*, 2006, Wikel, 2013). La modulation de la production des cytokines telles que les TNF- α ou IL-10 a aussi été rapportée (Brossard & Wikel, 1997, Skallova, *et al.*, 2008).

III. Matériels et méthodes

A. Matériel biologique utilisé.

Le matériel biologique utilisé est le même que celui du chapitre précédent. À savoir des tiques de l'espèce *O. porcinus* de Madagascar, la souche de virus Ambaton/02 de Madagascar et 48 porcs domestiques large-white EOPS. Ils ont également été maintenus et traités dans les mêmes conditions avant l'expérience.

B. Plan de l'essai et suivi des porcs

Les porcs ont été répartis en 6 groupes (tableau 25). Deux groupes de 15 porcs ont reçu une inoculation intradermique dans une oreille avec seulement du virus (ID ASFV), ou avec un mélange de virus et SGE (ID ASFV+SGE). Pour ces groupes, une partie (soit 18 porcs) ont reçu une forte dose de virus de 10^4 HAD₅₀/porc appelée High Dose (HD) et les autres (12 porcs) ont reçu une faible dose de 10^2 HAD₅₀/porc, appelée Low Dose (LD). Les quatre autres groupes de porcs n'ont pas reçu de virus : I) un groupe était mordu par des tiques non infectés (TICK), II) un groupe recevait une inoculation intradermique de SGE seul (ID SGE), III) un groupe recevait une inoculation intradermique de milieu (ID MEM) et IV) un groupe était le contrôle négatif (NEG).

À l'exception du groupe NEG, chaque porc recevait 5 inoculations intradermiques de 200 μ l, ou 5 tiques, sur une oreille. L'autre oreille étant utilisée comme contrôle interne pour tenir compte des variations individuelles lors du comptage des cellules (macrophages et cellules de Langerhans).

Groupe	ID ASFV		ID ASFV+SGE		TICK	ID SGE	ID MEM	NEG
Inoculation de virus	essai HD	essai LD	essai HD	essai LD	Non	Non	Non	Non
Nb de porcs à 1 hpi	9	6	9	6	10	3	1	4
Nb de porcs à 48 hpi	6	4	6	4	8	2	0	4
Nb de porcs à 5-8 Jpi	3	2	3	2	6	0	0	4

Tableau 25 : Nombre de porcs par essai, groupe de traitement (salive de tique et virus de la PPA) et période post inoculation. Nb : nombre de porc vivant à 1 – 48h et 5-8 jours post inoculation ; hpi : heures post-inoculation; Jpi : jours post-inoculation

La température rectale et les signes cliniques des porcs ont été surveillés quotidiennement et une pesée est régulièrement réalisée, ainsi que des prélèvements sanguins. Excepté pour le groupe NEG, 1/3 de porcs ont été abattus à 1h et 48h après inoculation dans chaque groupe de porcs (Tableau 25). Les autres porcs ont été abattus entre 5 et 8 jours en fonction de leur score clinique. Un examen post-mortem est aussi systématiquement réalisé avec prélèvement des organes lymphoïdes (la rate, les amygdales et les ganglions lymphatiques parotidiens) et des oreilles.

C. Analyse des prélèvements

Les échantillons sanguins ont été collectés de la même manière que l'essai du chapitre 2, avant l'inoculation et dans des intervalles de 1 à 3 jours : (i) sur tube hépariné pour l'isolement du virus, (ii) sur EDTA pour le comptage des cellules sanguines (MS9 hematology analyzer, Melet Schloesing Laboratoires, Osny, France) et pour la détection du génome du virus de la PPA par PCR en temps réel (Tignon *et al*, 2011). Les échantillons de sérum ont été purifiés à partir des échantillons de sang coagulé récoltés dans des tubes secs (Vacuette 8 ml Z Serum Sep Clot Activator, Greiner Bio-One, Dutscher, France) par centrifugation à 3000g pendant 5 minutes pour la quantification des cytokines. Les cytokines IL-6, IL-12 et TNF- α ont été mesurés par des kits ELISA (R&D systems, Minneapolis, USA) et l'haptoglobine était mesurée avec le kit TRIDELTA Development LTD kit, (Eurobio, Courtaboeuf, France). L'IFN- α a quant à lui été quantifié par un test ELISA développé dans le laboratoire par (Jamin *et al.*, 2006).

La détection du génome viral dans les prélèvements sanguins, ainsi que dans les organes lymphoïdes prélevés était faite par PCR en temps réel (Tignon *et al* , 2011) après une extraction d'ADN avec le kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, Courtaboeuf, France). Pour chaque porc euthanasié à 48h, 4 échantillons différents ont été extraits des ganglions lymphatiques parotidiens de l'oreille inoculée (PLI). Un échantillon de rate, amygdale et deux échantillons différents de ganglions lymphatiques parotidiens du côté opposé (PLO) ont été extraits. Les organes dont les résultats de PCR ont été les plus tardifs ($C_t > 40$) ont été aussi analysés par isolement viral pour confirmer la présence de virus vivant. Les résultats de détection de l'ADN viral ont été définis en quatre catégories : i) négatif ($C_t > 45$), ii) faiblement

positif, c'est-à-dire autour du seuil de détection de la PCR Temps Réel sur organe ($37 < C_t \leq 45$),
iii) positif ($26 < C_t \leq 37$) et iv) fortement positif ($15 < C_t \leq 26$)

D. Utilisation des tiques et préparation des glandes salivaires des tiques *Ornithodoros porcinus*.

Des groupes de 5 tiques adultes ont été utilisés comme témoin de gorgement sur une seule oreille par porc, suivant le même dispositif que celui décrit lors des essais de transmission du chapitre 2.

Un autre groupe de tiques a été utilisé pour préparer des extraits de glandes salivaires (SGE). La concentration de SGE utilisé était l'équivalent d'une glande salivaire de tiques adultes pour simuler le repas de 2 tiques.

La dissection des glandes salivaires de femelles se fait sous une loupe binoculaire (Figure 32). Un carré d'adhésif double face (3x3 cm environ) est collé sur une boîte de Petri maintenue au froid par de la glace. La face ventrale de la tique est ensuite posée sur l'adhésif. À l'aide d'un scalpel, la tique est coupée horizontalement entre la 1^{re} et la 2^e paire de pattes puis verticalement par le milieu. La tique est ensuite immédiatement recouverte de PBS 1X avant de prélever les glandes salivaires avec des pinces Dumond. Les glandes salivaires sont ensuite rincées par des bains de PBS pour éliminer les potentielles contaminations (débris cellulaires, contenu de l'intestin...). Les glandes salivaires sont ensuite broyées dans 150 µl de PBS puis centrifugées pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est au final homogénéisé dans une solution de 400 µl MEM ou de MEM + virus avant d'être inoculé aux porcs à une concentration protéique de 0,3µg/µl.

Pour réaliser le prélèvement des glandes salivaires, il est préférable de travailler sur tique vivante car les tiques congelées sont difficiles à traiter. Les glandes salivaires sont des organes fragiles qui ont tendance avec la congélation à se déliter et à perdre leur structure globulaire permettant de les distinguer aisément des autres organes. De plus, à cause de la possible rupture de l'intestin lors de l'ouverture de la tique et parce que la congélation favorise la formation d'agglomérats, du contenu intestinal se retrouve alors autour des glandes salivaires. Un nettoyage par des bains de PBS successifs devient peu efficace pour nettoyer correctement les glandes salivaires.

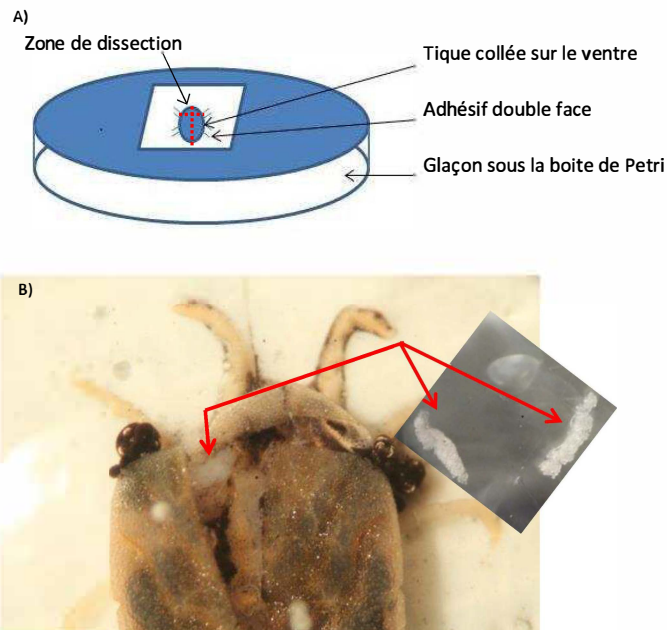


Figure 32 : Représentation du protocole de dissection sur une femelle *O. porcinus*.

A) la tique est disséquée suivant les pointillés rouges. B) photographie d'une tique lors de la dissection, les flèches rouges montrent la position des glandes salivaires dans la tique, puis leurs morphologies dans un bain de PBS 1x une fois prélevées.

E. Études immuno-histologiques

Afin d'étudier l'effet local d'extrait de glandes salivaires de tiques sur la réponse immunitaire du porc et l'infection par le virus de la PPA chez le porc, des coupes histologiques cryo-congelées de biopsie de peau d'oreille ont été réalisées au point d'injection et de morsure des tiques en vu de marquage par immunofluorescence.

1. Préparation des coupes histologiques d'oreille

* Prélèvement des biopsies

Une étude dermatologique (Werner, 2009) indique que le prélèvement des biopsies par punch est indiqué dans le cas de lésions de peau lors de maladies inflammatoires et infectieuses. L'auteur précise qu'une taille inférieure à 5 mm de diamètre devient difficile à analyser à cause des traitements auxquels sont soumis les échantillons tout au long du processus. Les dommages créés peuvent compromettre l'examen histologique. De plus,

suivant l'ampleur macroscopique des lésions, un échantillon trop petit ne permettrait pas une analyse assez discriminante des lésions ou de leur développement. Par ailleurs, la prise d'échantillons de peau saine est préconisée lors des bonnes pratiques de dermatologie pour comparer de manière appropriée les lésions avec l'état originel de la peau.

Dans notre étude, une fois le porc euthanasié, les oreilles sont prélevées dès leur arrivée en salle d'autopsie. Les oreilles sont ensuite prises en photographie pour identifier les biopsies *a posteriori* sur les lésions microscopiques et macroscopiques (Figure 33). Les biopsies sont réalisées à l'aide de punches à biopsie de 8 mm de diamètre sur les 2 oreilles de chaque porc : l'oreille inoculée et l'oreille opposée servant de témoin intra-individuel. Elles sont décollées du cartilage à l'aide d'un scalpel, ce qui permet de garder une structure de densité homogène lors des coupes. Elles sont ensuite directement plongées dans un bain de paraformaldéhyde (PFA) 4 % toute la nuit. Le choix du PFA comme agent de fixation s'est imposé d'une part parce qu'il permet d'inactiver le virus et de manipuler plus facilement les biopsies, et d'autre part parce qu'il permet de figer les structures tissulaires et d'immobiliser *in situ* les antigènes (Garaud & Roussel, 2004). Un rinçage au PBS est ensuite réalisé avant d'imbiber de sucrose les biopsies par 3 bains successifs de concentration 10 %–20 %–30 %. Ce traitement permet de retarder l'apparition des cristaux de glace lors de la cryocongélation et diminue ainsi la détérioration des tissus. Un dernier rinçage au PBS est réalisé avant d'enrober les biopsies dans de l'optimal cutting temperature compound (OCT) (Sakura Finetef, USA). Ce produit permet une meilleure cryoconservation et une manipulation aisée des échantillons lors des cryocoupes. Pour finir, les biopsies sont cryocongelées dans de l'isopentane refroidi dans de l'azote liquide.



Figure 33 : Photographie d'oreilles de porc prélevées 1h après l'inoculation, juste avant le prélèvement des biopsies.

* Cryosection

Des coupes sériées de 12 μ m d'épaisseur sont réalisées manuellement de façon à obtenir une vue d'ensemble de la biopsie sur une même lame. Les coupes sont déposées sur plusieurs lames, également réalisées en série, pour mettre en relation les zones tissulaires étudiées par différents traitements d'immunomarquage ou de colorations.

Au final, 10 à 25 lames sont réalisées pour chacune des 125 biopsies provenant de 42 porcs, elles contiennent chacune 12 coupes sériées de la biopsie (Figure 34B). Cependant, parmi les 125 biopsies, 49 biopsies, n'ont pas pu être exploitées après la coupe à cause d'une mauvaise qualité des lames utilisées. Elles provenaient de 21 porcs, les biopsies de 10 porcs ont été totalement inexploitable, et certaines des 11 autres porcs ont pu l'être.

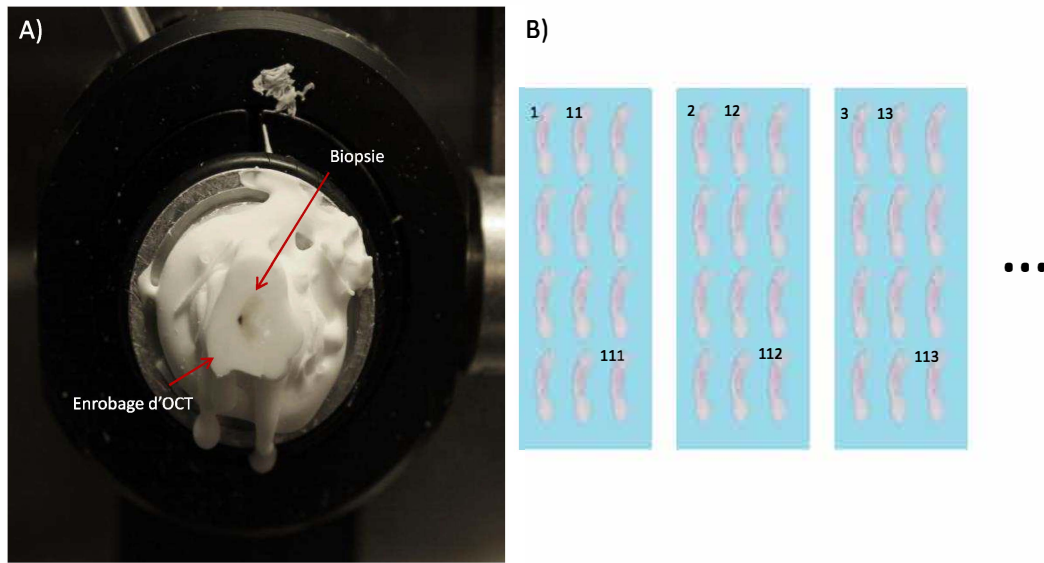


Figure 34 : Cryocoupe de biopsies de peau de porc.

A) Photographie d'une biopsie en cours de coupe, le point foncé est l'endroit d'une morsure de tique. B) méthode de coupe en série avec un exemple sur 10 lames. Les numéros correspondent à l'ordre des coupes.

* Marquage par immunofluorescence indirecte des lames

Les coupes histologiques sont déshydratées 15 min à 37 °C avant les traitements de marquage ou de coloration. Un protocole d'immunomarquage indirect a été réalisé d'après le protocole de routine de la plateforme d'histologie INM-RHEM de Montpellier avec des anticorps primaires non couplés (Tableau 26) et des anticorps secondaires correspondant : Alexa 568 pour le filtre rouge RHOD/CY3 (X545/25, E605/70), Alexa 488 pour le filtre vert GFP-FITC (X470/40, E525/50) et Alexa 350 pour le filtre bleu DAPI (X350/50, E460/50). Chaque anticorps secondaire a été sélectionné pour ne diffuser que dans le filtre adéquat. L'anticorps secondaire Alexa 350 a été utilisé dans le but de mettre au point un triple marquage discriminant les macrophages infectés par le virus de la PPA. Toutefois, il n'a pas abouti car l'Alexa 350 est difficilement visible par nos filtres et car l'anticorps primaire α -VP220, marquant les cellules infectées, ne s'est pas lié sur nos coupes. Les noyaux ont été marqués par une solution de Hoechst visible par le filtre bleu. Le choix des anticorps a été en grande partie réalisé sur la base de la publication de (Piriou-Guzylack & Salmon, 2008) (Figure 35).

Pour prévenir une fixation aspécifique des anticorps lors du protocole de marquage, les lames ont été placées 1h dans un bain de PBS enrichi de 3% sérum Albumine de chèvre(GSA). Puis les coupes ont été incubées une nuit avec l'anticorps monoclonal primaire (mAb) dans du PBS contenant 10 % de GSA et 0,03 % de Triton X100, puis lavées dans 3 bains de PBS et incubées 2h avec l'anticorps secondaire à température ambiante. Finalement, une solution de Hoechst (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) est ajoutée aux coupes après de nouveaux bains de rinçage au PBS. Les sections sont enfin montées dans du milieu de Mowiol 4-88 (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) pour analyse.

Anticorps primaire	Isotype	Clone	Production	Cible cellulaire	Concentration utilisée	Référence - laboratoire	Remarques
SWC3 / CD172	IgG1	74-22-15	Souris anti-porc	pan-myéloïde porcin	1/100	732790 - Beckman	Utilisé en simple marquage
	IgG2b	74-22-15a			1/50	PG2031 - Vetmed	Utilisé en double marquage CD163
CD14	IgG2b	MIL-2	Souris anti-porc	Cellules dendritiques et macrophages	1/50	MCA1218 – ABC serotec	Non utilisable en double marquage pour une meilleure discrimination des macrophages
PPA	IgG1	1BC11	Souris anti-porc	Protéine de capsid VP72	1/50	VP72 ASFV - Ingenasa	Marquage ok pour la peau et les ganglions
	IgG2a	17AH2		Protéine de capsid VP220	1/50	vp220/150 - Ingenasa	Marquage non fonctionnel sur la peau et les ganglions
	polyclonal		Sérum immun de porc	Cellule infectée par le virus de la PPA	1/100	Anses – VIP	
CD163	IgG1	2A10/11	Souris anti-porc	Monocytes et macrophages	1/100	MCA2311 – ABC serotec	Utilisé en double marquage SWC3.
	IgG1	SP96	Lapin anti-porc				Utilisé dans le cadre du triple marquage SWC3-PPA
SWC8	IgM	MIL3	Souris anti-porc	Leucocytes, sauf monocytes	1/25 et 1/50	MCA1219 – ABC serotec	Marquage aspécifique
S-100	IgG1	SH-B1	Souris anti-porc / anti-humain	Cellules dendritiques interdigitales	1/1000	S2532 - Sigma Aldrich	Marquage ok dans les ganglions

Tableau 26 : Tableau récapitulatif des anticorps primaires testés.

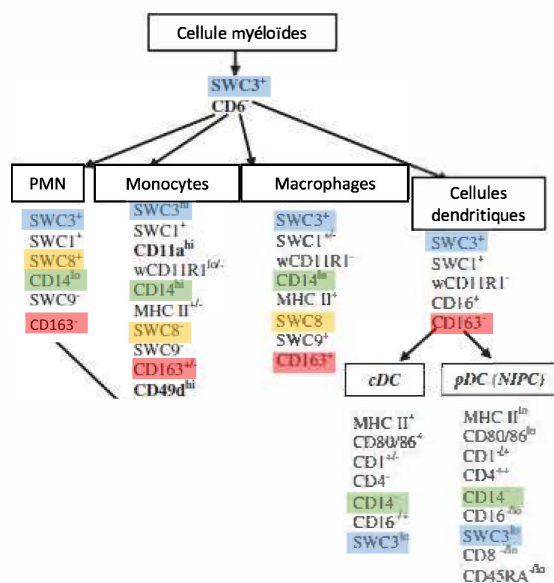


Figure 35 : sélection des anticorps primaires pour étudier les macrophages et les cellules de Langerhans. Les phénotypes des cellules myéloïdes du sang de porcs sont discriminés par leur CD (cluster de différenciation). PMN : polymorphonucléaire ; + : exprimé ; - : non exprimé ; +/- : variable ; hi : haute densité d'expression ; low : faible densité d'expression. (Piriou-Guzylack & Salmon, 2008)

* Coloration des lames

Le Laboce 22 a réalisé des colorations Hemalun – Éosine – Safran sur des coupes de 108 biopsies traitées en paraffine. Un rapport de l'examen histologique des coupes a fourni un descriptif détaillé des lésions tissulaires détectables et de leurs intensités : inflammation, hémorragie, dermite périvasculaire, vascularite, hyperkératose, hyperplasie de l'épiderme, œdème, nécrose ou encore congestion. Ensuite, les lésions ont été scorées en fonction de leur importance et de leur intensité pour pouvoir réaliser des comparaisons entre groupes de porcs, selon une méthode semi-quantitative : œdème (1-3), hémorragie (4-6), inflammation (7-9), dermite (10-12), ou nécrose (13-15).

Une partie des biopsies cryoconservées a été traitée par le kit de coloration Hemacolor® (Merck Millipore, Darmstadt, Allemagne) contenant un colorant rouge à base d'éosine et un colorant bleu à base d'azur, permettant de discriminer principalement des mastocytes.

2. Analyse d'images

* Prise de photographies

Après traitement, les coupes ont été observées au microscope à épifluorescence, (Olympus BX41, Scop Pro, Itteville, France) couplé à une caméra EXI Aqua (Q Imaging, Surrey, Canada). Entre une à trois coupes par lame ont été sélectionnées pour leur intérêt et leur représentativité. L'ensemble de la zone lésée, ainsi qu'une large partie des coupes, ont été photographiés, permettant d'avoir une vue d'ensemble des zones lésées et alentour. Après avoir ajusté la netteté, le gain (intensité), les gammas (contraste) et le temps d'exposition, les photographies sont réalisées par série de 3 ou 4 (simple marquage ou co-marquage) sur une même zone. Une photographie a été prise avec un filtre DAPI révélant le marquage des noyaux par DAPI, une avec un filtre GFP-FITC révélant l'autofluorescence dans le cas des marquages simples, ou le marquage par l'anticorps secondaire ALEXA 488. Le troisième filtre RHOD/CY3 révélait le marquage par l'anticorps secondaire ALEXA 568. Enfin le dernier filtre SYTOX BLUE (X436/20, E480/40), est utilisé seulement dans les cas de co-marquage révélant l'autofluorescence. Les coupes ont été balayées par une série moyenne de 15 photographies d'un même filtre avec un chevauchement suffisant pour réaliser un panorama, soit une moyenne de 35 à 60 photographies par coupe.

* Soustraction de l'autofluorescence

L'autofluorescence est un problème connu et courant en histologie, tous les tissus émettant naturellement de la fluorescence. L'intensité peut cependant varier en fonction de la nature des tissus, des matériaux utilisés pour l'analyse et des traitements. Il est possible de passer outre ce problème en photographiant la préparation avec deux filtres, l'un adapté au fluorochrome et l'autre permettant d'observer uniquement les éléments autofluorescents. D'autres techniques permettent de diminuer chimiquement l'autofluorescence, comme l'utilisation du Noir Soudan ou en réalisant un fading à la lumière. Toutefois, ces techniques ont souvent une action négative, soit en masquant les sites réactifs, soit comme dans le cas du fading en dégradant les sites d'intérêt.

L'extinction de l'autofluorescence dans notre étude a été suffisante par la prise de photographies de filtres différents (Figure 36). En effet, le logiciel Image Pro-Plus (Media Cybernetics) transforme les prises de vues en images en noir et blanc, ce qui permet sans aucune difficulté de soustraire l'intensité lumineuse des images d'autofluorescence à celles des images du marquage d'intérêt. Ainsi, chaque image prise par filtre d'intérêt : bleu, rouge et vert dans les cas de co-marquages, est traitée.

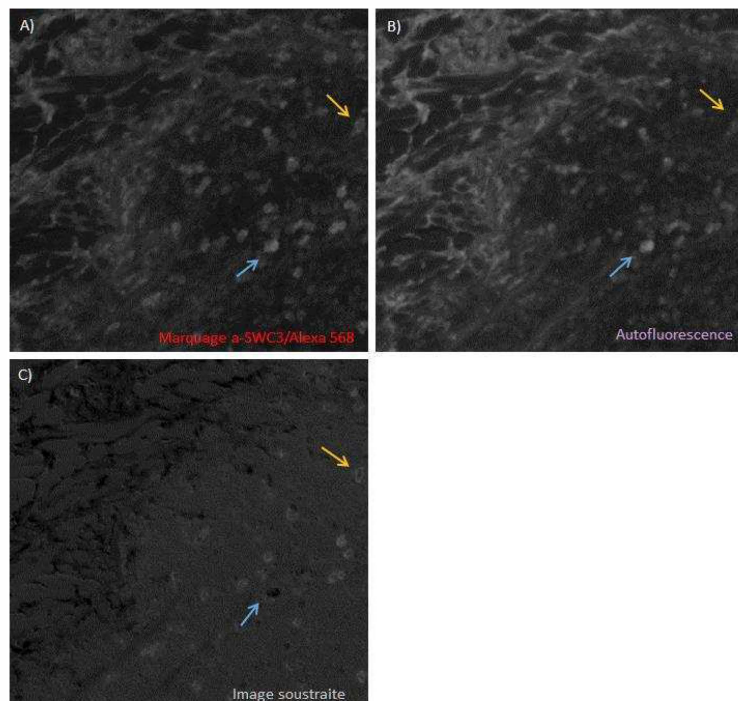


Figure 36 : Exemple de l'intérêt de la soustraction d'autofluorescence d'après un monomarquage α -SWC3/Alexa 568.

A) Image brute prise par le filtre rouge. B) Image brute prise par le filtre vert (représentant l'autofluorescence de la coupe histologique de peau de porc). C) Image une fois l'intensité de l'autofluorescence soustraite A)-B). La flèche bleue montre une cellule autofluorescente qui « disparaît » après la soustraction, la flèche orange montre une cellule qui est mise en valeur après la soustraction.

* Réalisation de panoramas et comptage des cellules

La reconstitution du panorama de chaque filtre de chaque coupe est réalisée à l'aide du logiciel Adobe Photoshop Element 2.0 (Adobe Systems Incorporated). Les images utilisées sont celles traitées pour éliminer l'autofluorescence. Elles sont ensuite teintées et superposées, action « merge » avec le logiciel Image Pro-Plus. Au total, plus de 730 panoramas ont été réalisés (Tableau 27)

Le comptage des cellules d'intérêt a été réalisé manuellement après application de filtres de taille et d'intensité permettant de mieux discriminer les zones d'intérêt. Le comptage des cellules de Langerhans a été réalisé suite au marquage par l'anticorps α -SWC3 et par discrimination morphologique (Figure 37A et Figure 38) tout le long du transect épidermique sur l'oreille opposée et au dessus de la zone de lésion sur l'oreille traitée. La densité en LC est

exprimée en $LC.\mu m^{-1}$. De plus, suite aux observations des lésions histologiques et de la distribution des LC au sein de l'épiderme, les biopsies ont été distribuées en 5 classes : i) classe « mechanical » (mécanique), qui inclut les biopsies ayant des lésions de l'épiderme dues à l'introduction de l'aiguille ou des mandibules de tiques ; cette classe est caractérisée par une absence totale de LC dans la région lésée et une densité normale à chaque extrémité, ii) la classe « physiological » (physiologique), qui montre une disparition de LC au-dessus de la lésion avec une réapparition graduelle des deux côtés, iii) la classe « scab » (croûte), qui correspond au phénomène de cicatrisation de la blessure ; il n'y a pas de LC sous la croûte et une réparation graduelle des deux côtés, iv) une classe « deep » (profonde), qui concerne seulement les groupes inoculés avec des lésions dans le derme profond mais une distribution non modifiée des LC, et v) une classe « no effect » (sans effet), qui présente une distribution normale des LC sous la lésion du derme.

En ce qui concerne l'analyse des macrophages, (Figure 37B et Figure 38), ils ont été discriminés par un co-marquage α -SWC3 / α -CD163 et comptabilisés dans 4 rectangles de surface identiques (deux dans le derme et deux dans le derme profond) pour l'oreille opposée et dans ces 4 rectangles plus la zone de lésion pour les oreilles traitées.

Quant aux cellules infectées par le virus de la PPA, elles sont comptées sur toute la surface des biopsies des ganglions parotidiens après un marquage α -VP72 et sur toute la surface des zones lésées dans les biopsies de peau d'oreille.

	Épiderme						Ganglion		
	SWC3	SWC3 - CD163	PPA	CD14	SWC8	Coloration	SWC3 - S100	PPA	Coloration
Nombre de biopsies	58	74	41	55	15	75	11	15	22
Nombre de panoramas	142	243	103	142	30	Scanner	55	15	Scanner

Tableau 27 : Tableau récapitulatif du nombre de biopsies réalisées par traitement et nombre de panoramas reconstitués provenant de 32 porcs.

Les lames traitées par coloration ont été scannées au scanner de lames de la plateforme d'histopathologie H2P2 de Rennes. À cause de l'autofluorescence et du fading des anticorps secondaires, la pertinence des marquages SWC8 et CD14 n'a pu être évaluée qu'après avoir terminé tout le processus de réalisation des panoramas sur plusieurs biopsies pour une bonne comparaison des groupes de porcs. Cf tableau 26 pour la description des anticorps.

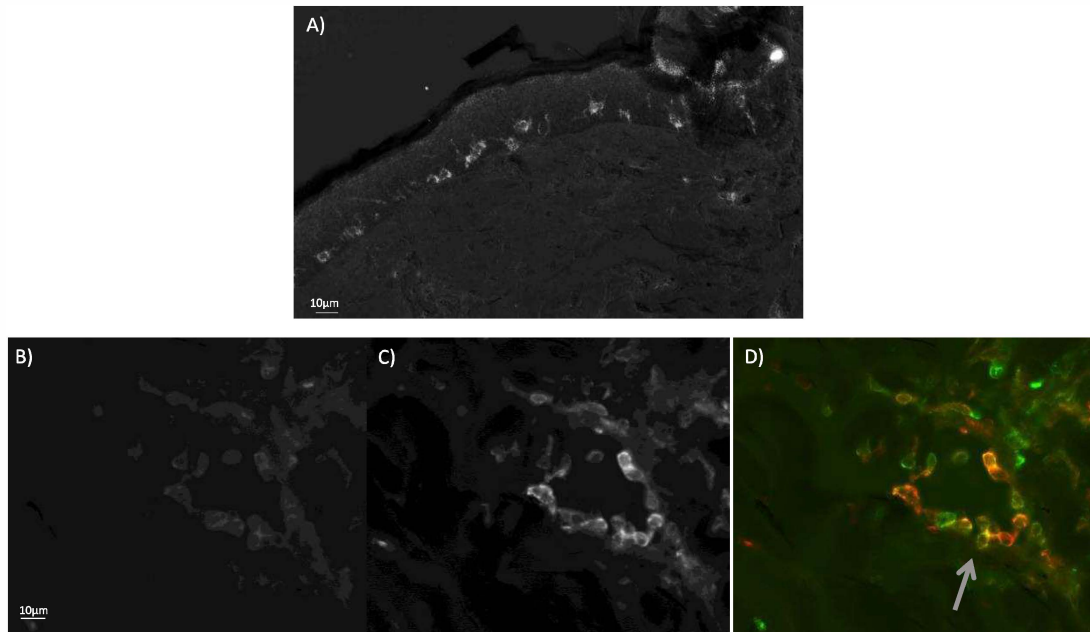


Figure 37 : Biopsies de peau d'oreille de porcs marquées par immunofluorescence par les anticorps α -SWC3 et α -CD163.

A) Cellules de Langerhans de l'épiderme marquées α -SWC3, B) marquage SWC3, C) CD163, D) Merge, les cellules en jaune sont des macrophages.

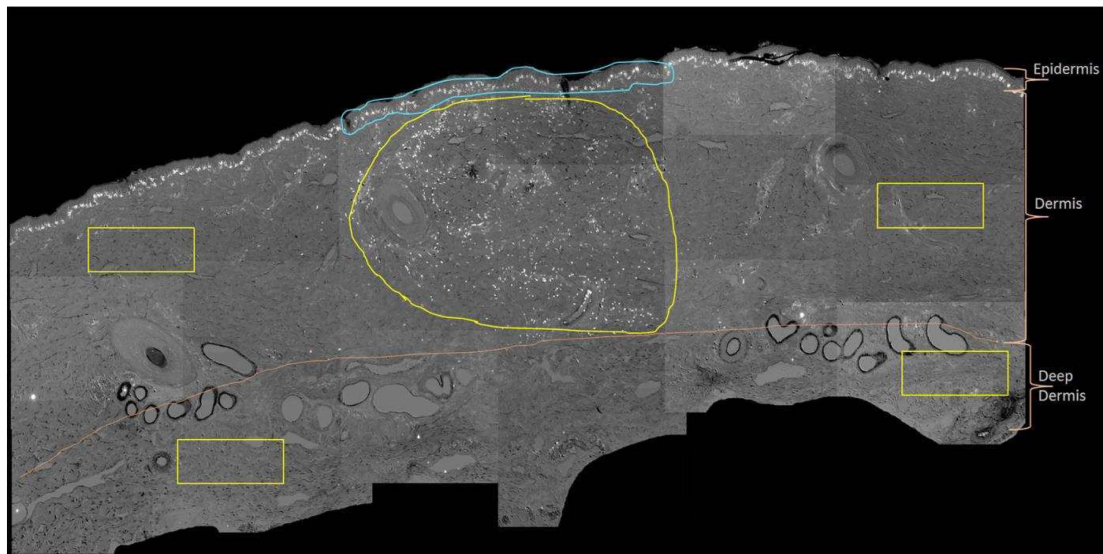


Figure 38: Méthode de comptage des cellules dans l'épiderme des biopsies de peau d'oreille traitées.

Les cellules de Langerhans sont dénombrées dans le transect délimité en bleu et es macrophages dans les zones jaunes (4 rectangles de même surface et la zone circulaire correspondant à la zone de lésion). Dans l'oreille opposée, les LC sont comptées tout le long de l'épiderme et les macrophages seulement dans les 4 rectangles jaunes.

F. Analyses statistiques et exploitation des résultats

Toutes les analyses ont été effectuées à l'aide du logiciel R version 3.0.1 (R Development Core Team 2012). Le test de Wilcoxon a été utilisé pour comparer 2 groupes de données appariées, il évalue l'évolution des données d'un groupe à une date post-infection par rapport aux données de ce même groupe avant l'infection. Le test de Mann-Whitney est un test non paramétrique qui est utilisé pour comparer 2 groupes de données non appariées. Il est utilisé sur une taille d'échantillon petite et hétérogène, pour évaluer la significativité d'une évolution des données d'un groupe par rapport aux données d'un autre groupe recueillies le même jour post-inoculation. Le résultat de tous les tests statistiques utilisés est exprimé avec un risque d'erreur de 5 %. Le résultat n'est pas significatif () si $p > 0.05$, il est significatif (*) si $p < 0.05$, et il est très significatif (**) si $p < 0.01$.

Pour d'autres données, des tests plus poussés ont pu être réalisés en utilisant des modèles statistiques adaptés aux petits effectifs. Dans tous les modèles, les facteurs d'intérêt sont les doses de virus de la PPA (catégories : pas de virus (No ASFV), faible dose de virus (LD), forte dose de virus (HD)), la salive de tique (catégories : pas de salive (No tick saliva), morsure de tique (Tick saliva), extrait de glandes salivaires (Tick salivary glands)) et temps après l'inoculation (catégories : 1hpi et 48 hpi).

Pour les températures rectales et les scores cliniques, l'analyse préliminaire des données exploratoires révèlent des schémas sigmoïdes pour la réponse, avec un délai avant le début de la réponse, suivi par une élévation puis un plateau précédant la phase de mortalité. Pour modéliser ces données, nous avons utilisé un modèle logistique non linéaire à 3 paramètres (Pinheiro & Bates, 2006). Le premier paramètre (ϕ_1) est la valeur du plateau (asymptote horizontal quand le temps passe) ; le second paramètre (ϕ_2) est le paramètre de la forme (l'inclinaison de la courbe au point d'inflexion). Comme la température rectale a montré des variations inter individuels (gamme : 39,1 – 39,8 °C le jour de l'inoculation expérimentale), nous avons modélisé la variation de la température rectale depuis le jour de l'inoculation plutôt que la température rectale simple.

Les modèles logistiques non-linéaires ont été créés en utilisant les moindres-carrés généralisés (GLS), et une estimation par maximum de vraisemblance (ML). Durant la construction du modèle, le critère d'information Akaike (AIC) corrigé pour des petites tailles d'échantillons a été utilisé pour choisir les meilleures options (AICc: (Hurvich & Tsai 1995, Burnham & Anderson, 2002): $AIC=2 \log(L) + 2k$ et $AICc=AIC + 2k(k+1)/(n-k-1)$, où L est le maximum de vraisemblance, n le nombre d'observations et k le nombre de paramètres (coefficient) du modèle. AICc a été utilisé pour comparer les modèles ayant une même réponse. Les modèles avec le plus faible AICc ont été considérés comme meilleur.

De plus, la méthode d'estimation GLS a permis de rendre compte des corrélations dans les résidus du modèle avec des mesures répétées effectuées sur les mêmes porcs, ainsi que de l'hétéroscedasticité des résidus (Hurvich & Tsai 1995). Le porc a été défini comme un facteur de groupe et une structure de corrélation homogène intra-porc a été utilisée pour les résidus.

Pour la détection de l'ADN du virus dans les ganglions parotidiens par PCR temps-réel, le nombre de C_t a été utilisé comme une variable quantitative. Étant aussi confronté à des mesures répétées sur un même échantillon et 2 ganglions parotidiens par porc, un modèle linéaire à 2 niveaux et effet mixte a été utilisé (Goldstein, 1999), avec la dose de virus, la salive de tique et le temps en effet fixe et 2 effets nichés à effet aléatoire (facteur groupé) associé avec une origine : (i) porc, and (ii) ganglions parotidiens du porc. Les modèles sont affinés par la méthode de ML (Pinheiro & Bates, 2006).

Pour l'analyse de la densité des cellules de Langerhans et des macrophages, la corrélation intra-porc des résidus a été enlevée en prenant chaque porc pour son propre contrôle, pour chaque porc i :

- La densité des cellules (cellules de Langerhans ou de macrophages) dans les oreilles opposées (control) : $d_{i,ref} = \sum_i y_{i,ref} / \sum_i z_{i,ref}$, où $y_{i,ref}$ est le nombre de cellules dans une zone $z_{i,ref}$. Pour les cellules de Langerhans, $z_{i,ref}$ est une ligne transect de longueur connue ($z_{i,ref}$) localisée dans l'épiderme. Pour les macrophages, cela a été compté dans des rectangles d'aires connus ($z_{i,ref}$),
- La densité des cellules dans les oreilles traitées : $d_{i,obs} = \sum_i y_{i,obs} / \sum_i z_{i,obs}$. Pour les cellules de Langerhans, $z_{i,obs}$ est la ligne transect au dessus du point d'inoculation. Pour les macrophages, le comptage a été fait dans la zone de lésion.
- La différence de densité dans les cellules : $\delta_i = d_{i,ref} - d_{i,obs}$. Un résultat positif de δ_i indique une baisse de densité cellulaire. C'est cette différence de densité qui a été utilisée pour les modèles.

Un modèle linéaire avec des adaptations particulières a été créé. En effet, δ_i est une différence de comptage de cellules qui a généralement montré une grande plage de valeur, avec des valeurs aberrantes (observations très différentes de la moyenne de la population). Pour tenir compte de cela, un modèle linéaire robuste, dans lequel les valeurs aberrantes ont une influence limitée sur les estimations des coefficients, a été utilisé (Venable & Ripley, 2002).

Les coefficients du modèle ont été choisis par itération re-pondéré des moindres carrés. En outre, en raison de la petite taille de l'échantillon (24 porcs affectés à 8 catégories différentes de traitement), il est difficile d'utiliser les conditions asymptotiques pour le calcul des valeurs de p associées aux tests sur les coefficients du modèle. Au lieu de cela, une méthode bootstrap sur les résidus du modèle telle que décrit par Davison and Hinkley (Davison & Hinkley, 1997)

a été utilisée. En bref, les coefficients estimés (modèle linéaire robuste) et les valeurs ajustées ont été considérés comme des valeurs fixes. Les résidus ont été échantillonnés avec remise, et une nouvelle réponse a été calculée en ajoutant les valeurs ajustées aux résidus échantillonnés. Le modèle linéaire robuste a ensuite été réévalué avec cette nouvelle réponse, et les coefficients obtenus ont été stockés. Cette boucle a été répétée B fois (avec de grandes valeurs de B : généralement 999, 1.999 ou plus). Les ensembles de coefficients de B ont été ajoutés à l'ensemble original. Les quantiles 2,5% et 97,5% de chaque série de valeurs de coefficients $B + 1$ (ou la combinaison linéaire de ces coefficients) ont ensuite été utilisés en tant qu'intervalles de confiance à 95%. Par exemple, la différence moyenne ajustée de la densité cellulaire $\hat{\delta}_i$ est une combinaison linéaire des coefficients du modèle. Pour savoir si les effets combinés du temps, de la dose de virus et de la salive de tiques (y compris les interactions possibles) sont significativement altérés, $\hat{\delta}_i$ (hypothèse nulle: $\hat{\delta}_i = 0$), les $B + 1$ valeurs pour un groupe donné (par exemple la salive de tique et la dose élevée de virus de la PPA à 48 hpi) ont été calculées, et évaluées si l'intervalle de confiance de 95% inclue la valeur de 0 (effet combiné non-significatif pour $\alpha = 0,05$) ou non (effet combiné significatif pour $\alpha = 0,05$).

Cependant, certaines données ne présentent pas d'analyses statistiques, parce que le nombre de réplicats n'était pas suffisant. Par exemple, les prélèvements sanguins des essais à faible dose d'inoculum n'ont pu être réalisés que sur 2 porcs par groupe à partir de 2 Jpi. En outre, la fréquence de prélèvement de sang n'a pas pu être réalisée de façon identique pour chaque groupe, à cause de contraintes techniques ou éthiques inhérentes à l'état de chaque groupe de porcs. Toutefois, l'exploitation qualitative des données, grâce notamment à des schémas de résultats qui se répètent entre les groupes (ASFV avec ou sans co-inoculation de SGE) ou entre les doses, associés à une évolution classique de la maladie déjà publiée (Blome *et al.*, 2013, Galindo-Cardiel *et al.*, 2013), permet d'interpréter nos résultats. Dans toutes les figures, les résultats sont présentés par des moyennes par groupe de porcs et les barres d'erreurs associées représentent l'erreur standard à la moyenne (SEM).

IV. Résultats

A. La réponse immune générale du porc : signes cliniques et physiopathologie

1. Scores cliniques et virémie

Les porcs ont présenté des symptômes seulement lorsque le virus a été inoculé, avec aucun signe clinique pour les groupes témoins négatifs NEG, TICK et ID SGE durant l'expérience. La progression de la maladie et les scores cliniques ont été similaires entre les groupes infectés quelle que soit la dose de virus (essais HD et LD), commençant par une perte d'appétit à 1-3 jpi, puis une hyperthermie le jour suivant à 2-4 jpi. Les porcs ayant reçus la forte dose de virus ont tous été euthanasiés 5 à 6 jpi pour raisons éthiques, alors que les porcs inoculés avec une dose plus faible ont été euthanasiés à 8 jpi. Le pic de la maladie, selon les scores cliniques, était retardé significativement d'un jour dans l'essai LD comparé à l'essai HD ($p=5 \times 10^{-3}$). Bien qu'un délai soit aussi observé entre les groupes avec ou sans SGE, il n'était pas significatif selon la prédiction du modèle ($p=0.83$) (Figure 39A, échelle de droite).

Le gain de poids moyen journalier a été calculé et tous les groupes infectés (ID ASFV, ID ASFV+SGE) ont perdu du poids dès 3 jpi quelle que soit la dose du virus, (exprimé en moyenne \pm écart type) : $-0,9 \pm 0,1$ (n=5) kg/jour pour l'essai HD et $-0,7 \pm 0,1$ (n=4) kg/jour pour l'essai LD, alors que les groupes non infectés (NEG, TICK, ID SGE, ID MEM) ont pris du poids jusqu'à 8 jpi ($0,9 \pm 0,1$ (n=7) kg/jour).

Pour les groupes ayant reçu du virus, le pic de température ($T > 40^\circ\text{C}$) a eu lieu avec un délai significatif d'un jour entre les porcs de l'essai HD à 3,3 Jpi et l'essai LD à 4,6 jpi ($p < 10^{-3}$, modèle logistique non linéaire) (Figure 39B). Dans les essais HD et LD, les températures rectales les plus hautes ont été observées pour les groupes ID ASFV+SGE pendant les trois premiers jours après le pic d'hyperthermie. Pour valider cet effet, les deux groupes (HD et LD) ont été considérés ensemble et les données de température ont été analysées sur les trois premiers jours après le pic d'hyperthermie. La moyenne des températures a été ajustée avec un modèle de régression linéaire des moindres carrés avec un effet fixe (salive de tiques *versus* pas de salive de tiques) et le porc comme facteur de groupe (structure de corrélation homogène intra-porc). La moyenne ajustée des températures du groupe ID ASFV+SGE a été significativement supérieure de $0,3^\circ\text{C}$ ($p=0,032$) par rapport au groupe ID ASFV.

Le virus a été détecté dans le sang dès 2 jpi quelle que soit la dose de virus. La charge de virus a été évaluée de « positive » à « fortement positive » pour les porcs abattus en même temps dans l'essai HD, mais « faiblement positive » pour cinq des huit porcs correspondants de l'essai

ID et « négative » pour les trois porcs restants. Une différence dans les niveaux de détection entre les essais a aussi été remarquée à 3 jpi. Puis, de 4 jpi jusqu'à la fin, aucune différence n'a été remarquée entre les groupes, avec ou sans SGE dans les deux essais (Figure 39A, échelle de gauche).

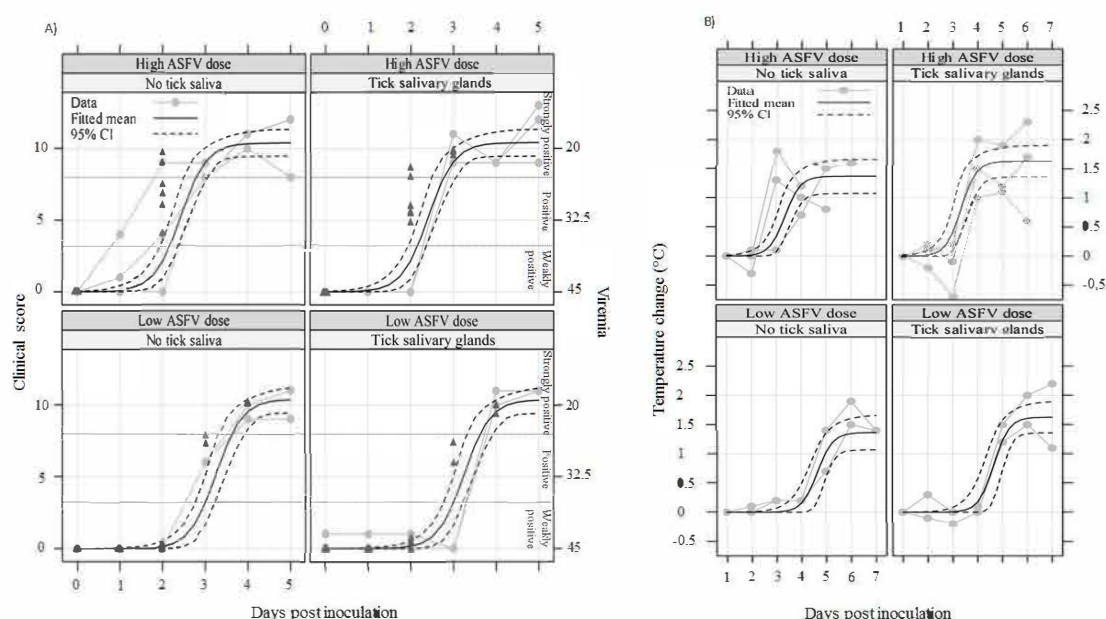


Figure 39 : scores cliniques, virémie et variation des températures rectales.

A) l'échelle pour les scores cliniques est indiquée sur la gauche, et l'échelle pour les résultats individuels de PCR Temps Réel est sur la droite. Les résultats de PCR Temps Réel (triangles gris foncés) sont définis en catégorie négative ($Ct > 45$), faiblement positive ($45 \geq Ct > 37$), positive ($37 \geq Ct > 25$) et fortement positive ($Ct \leq 25$). B) les températures rectales des porcs ont été enregistrées depuis le jour de l'inoculation.

2. Numération formule sanguine

La numération des leucocytes sanguins a été réalisée parce que la leucopénie (diminution des leucocytes sous le seuil de 7×10^6 cellules/ml) est un signe biologique caractéristique de la PPA. Le comptage des globules blancs sanguins périphériques pour les lymphocytes, les monocytes et les granulocytes étaient similaires entre les groupes de porcs avant l'inoculation du virus. Les résultats du groupe sans inoculum de virus ID SGE montrent une stabilité du nombre des leucocytes totaux durant les 5 premiers jours alors que les résultats en présence de virus (avec ou sans co-inoculation de SGE) montrent une déplétion leucocytaire (Figure 40A) qui peut être qualifiée de leucopénie à 3 jpi pour le groupe ID ASFV + SGE de l'essai haute dose (HD), et à 4

Jpi pour les groupes de l'essai faible dose (LD), elle coïncide aussi avec le début de l'hyperthermie des porcs. La leucopénie est relativement brève puisqu'elle ne dure qu'un à deux jours (tableau 28 et Figure 40A). Nous n'avons pas détecté de leucopénie dans le groupe ID ASFV de l'essai HD probablement en raison de l'absence de certaines prises de sang. Cette absence ne nous permet pas non plus de comparer plus en détail les groupes entre eux. Toutefois, le retard d'une journée entre la faible dose et la forte dose d'inoculum est bien visible pour les groupes de porcs ID ASFV + SGE.

Groupe	ID ASFV				ID ASFV+SGE				ID SGE*	
Virus de la PPA	HD		LD		HD		LD		Non	
Variable	Moyenne	SD	Moyenne	SD	Moyenne	SD	Moyenne	SD	Moyenne	SD
Période 1	7,4	2,2	10,7	2,3	9,2	0,7	8,3	2,4	11,1	5,6
Période 2	7,9	2,1	5,4	0,7	4,8	1,5	5,5	0,2	11,7	4,7
Période 3	17,4	5,6	13	7,9	16,1	6,6	13,8	7	14,9	5,5

Tableau 28 : cinétique du comptage moyen de leucocytes sanguins ($\times 10^6$ cellules/ml de sang) selon l'hyperthermie.

Période 1 : temps d'incubation avant le pic d'hyperthermie ; période 2 : jour du pic d'hyperthermie ; période 3 : temps après le pic d'hyperthermie jusqu'à la fin de l'expérience * le groupe ID SGE ne présente pas d'hyperthermie, donc les résultats sont séparés en trois périodes de 2 jours de 0 dpi à 6 dpi.

L'examen des sous-populations leucocytaires nous montre un profil similaire à celui des leucocytes pour les lymphocytes, les monocytes (Figure 40B et C) et les granulocytes, même si ce dernier profil est plus difficilement interprétable en raison de la grande variabilité interindividuelle, en particulier dans les groupes ID ASFV + SGE de l'essai LD (Figure 40D).

La forte augmentation des populations leucocytaires au dernier jour de l'expérience est principalement due aux variations interindividuelles et à une forte déshydratation des animaux malades. Les porcs du groupe ID SGE présentent eux aussi une augmentation des populations leucocytaires à 5 Jpi, probablement due à des troubles digestifs observés le jour de la prise de sang et le suivant.

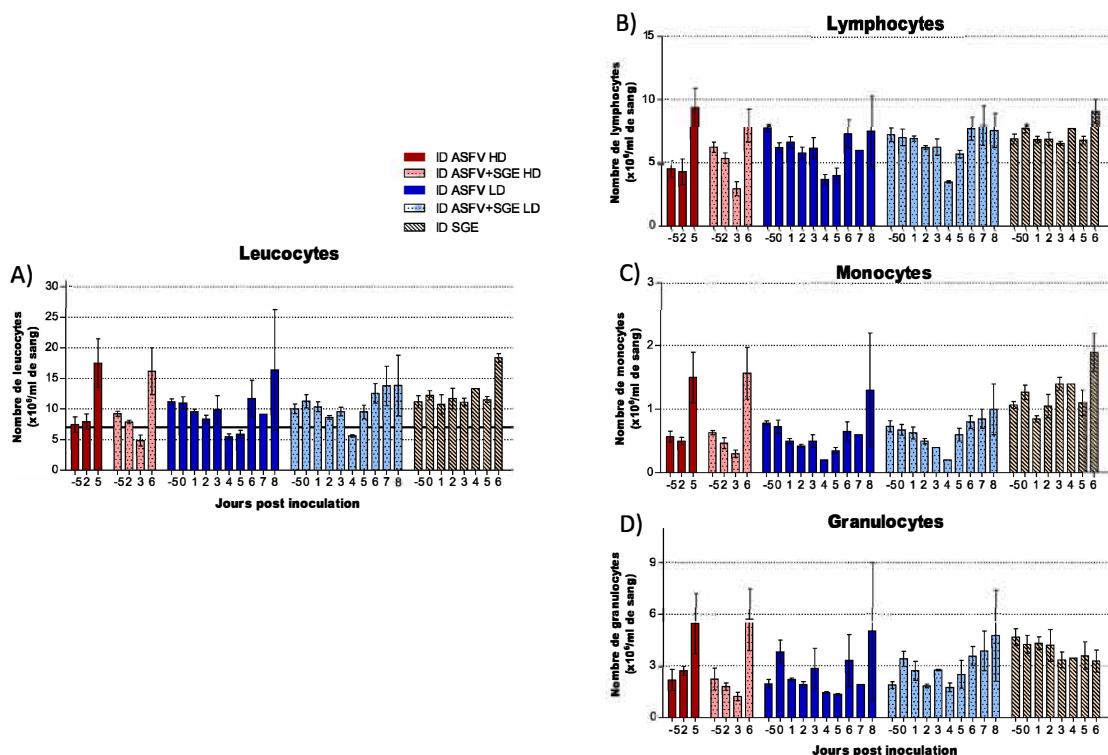


Figure 40 : Numération des leucocytes sanguins par groupe de porcs.

A) Leucocytes totaux ; B) Lymphocytes ; C) Monocytes ; D) Granulocytes

3. Dosage de cytokines

Les niveaux sériques des cytokines proinflammatoires telles que l'IL6, le TNF- α , l'IL-12, l'INF- α et d'une protéine de la phase aigüe de l'inflammation, l'haptoglobine, ont été dosés par ELISA. Nous avons choisi ces cytokines en raison de leur rôle dans la régulation du système immunitaire face à une infection et/ou en raison de leur rôle plus spécifique lors d'une infection par le virus de la PPA. Les cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF- α sont très rapidement sécrétées après une infection, et sont très actives lors d'une infection par le virus de la PPA (Salguero *et al.*, 2005). L'IL-12 est un régulateur de la réponse immunitaire cellulaire induite par de nombreuses cellules dont les monocytes, les macrophages et les mastocytes, elle est donc potentiellement importante dans la pathogénie de la PPA. La cytokine INF- α a tendance à être sous-réglée lors de l'infection par le virus de la PPA, elle est aussi impliquée dans le contrôle de la prolifération cellulaire en réponse aux infections virales (Afonso *et al.*, 2004, Karalyan *et al.*, 2012). Enfin, la protéine sérique haptoglobine a déjà été observée lors

de la phase aiguë de sécrétion de protéines régulant l'inflammation chez des porcs infectés par le virus de la PPA (Carpintero *et al.*, 2007).

À cause de contraintes techniques, les échantillons sanguins ont seulement été pris de façon journalière sur les porcs recevant la faible dose de virus de la PPA (avec ou sans SGE). Pour ces animaux, le type de réponses était similaire avec une augmentation du niveau des cytokines à 4 dpi pour IL-12, IFN- α et TNF- α (Figure 41, colonnes 2 et 4) et coïncide avec le début de l'hyperthermie et de la leucopénie des porcs malades. À cause du protocole de prélèvements, nous pouvons seulement supposer l'effet de la dose du virus de la PPA pour les animaux recevant des SGE (IFN- α and TNF- α (Figure 41, colonnes 3 and 4). À 3 dpi, une augmentation du niveau de TNF- α est remarquée dans l'essai HD, alors qu'il est significativement retardé d'un jour dans l'essai LD ($p=0.02$, Wilcoxon test). La même chose est observée pour IFN- α , IL-12, and IL-6. Une augmentation est aussi observée pour l'haptoglobine (données non montrées) mais cela reste sous le seuil de résultats positifs recommandé par le fabricant pour la détection d'inflammations.

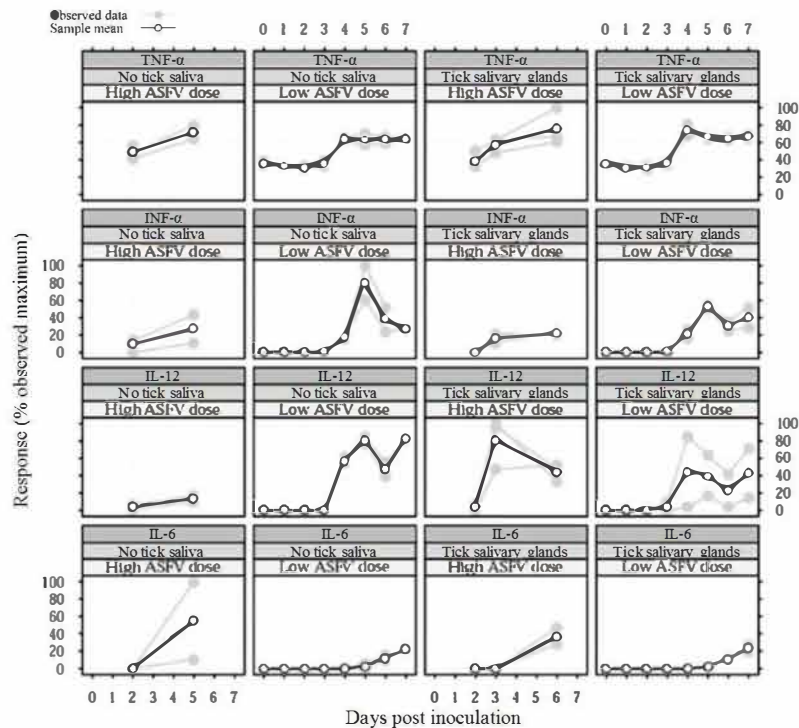


Figure 41 : Dosage sérique de cytokines : dosage du TNF- α , de l'IFN- α , de l'IL-6 et de l'IL-12 dans les sérums de porcs.

Pour chaque cytokine, quel que soit le groupe de porcs et le jour post inoculation, les résultats sont transformés en pourcentage de la concentration maximale observée considérée comme 100 %.

4. Lésions macroscopiques

Un score est attribué aux lésions observées sur les organes lors des examens post-mortem, comme décrit dans le Tableau 22 du chapitre 2. Les lésions observées sur les porcs n'ayant pas reçu de virus sont minimales, que ce soit à 1h, 48h pi ou à la fin de l'expérience. Seul le groupe ID SGE à 1 h pi présente des ganglions iliaques hémorragiques sur un porc et un ganglion iliaque réactif pour l'autre porc (Tableau 29A). Aucune différence significative n'est observable à 1h entre les groupes de porcs (Wilcoxon rank sum test, $p = 0,34$), contrairement à 48h pi où des lésions apparaissent sur les organes des porcs inoculés par le virus (Wilcoxon rank sum test, $p = 0,01$).

Les porcs ayant été inoculés avec du virus montrent à la fin de l'expérimentation des lésions caractéristiques des organes de porcs infectés par le virus de la PPA : rate noire et friable, thymus effondré, ganglions hémorragiques et ictère. Cependant, les scores des lésions ne sont pas différents entre les groupes avec et sans SGE, quelle que soit la dose de virus inoculée (Tableau 29B) (Wilcoxon rank sum test, $p = 0,83$).

A)		1h			48h		5 à 21J		
		TICK	ID SGE	Control	TICK	ID SGE	TICK	ID SGE	Control
Pas de virus	Rate	0,2 ± 0,4	0	0	0,2 ± 0,4	0,3±0,4	0	0	0
	GPI	0	0	0	0,2 ± 0,4	0	0	0	0
	GPO	0,2 ± 0,4	0	0	0,2 ± 0,4	0	0	0	0
	GHS	0	0	0	0	0	0,7 ± 1,6	0	0
	GA	0,2 ± 0,4	4,0 ± 2,8	0	0	1	0	0	0
	Ictère	0	0	0	0	0	0	0	0
	Thymus	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0,5 ± 0,5	4,0 ± 2,8	0	0,5 ± 0,5	1,3±0,4	0,7 ± 1,6	0	0
	Nbr de porcs	2	2	2	2	2	6	2	2

B)		1h		48h		5 à 21J	
		ID ASFV	ID ASFV + SGE	ID ASFV	ID ASFV + SGE	ID ASFV	ID ASFV + SGE
Forte dose	Rate	0	0	0	0	4	4,0 ± 1,0
	GPI	0	0,3 ± 0,6	0,7 ± 1,2	3	3,3 ± 1,2	3,3 ± 1,2
	GPO	0	0	0,7 ± 1,2	0	3,3 ± 1,2	2,7 ± 1,2
	GHS	0	0	0,7 ± 1,2	1,3 ± 2,3	4	5
	GA	0	0	0	0	3,7 ± 0,6	3,0 ± 1,0
	Ictère	0	0	0	0	6	2,3 ± 1,5
	Thymus	0	0	0	1	3,3 ± 2,9	4
	Total	0	0,3 ± 0,6	2,0 ± 2,0	5,3 ± 2,3	27,7 ± 2,9	24,3 ± 4,5
	Nbr de porcs	3	3	3	3	3	3
Faible dose	Rate	0	0	0	0	6	5,0 ± 1,4
	GPI	0,3 ± 0,4	0	2	1	5	5
	GPO	0	0	0	0	5	5
	GHS	0	0	0	0,5 ± 0,7	5,0 ± 1,4	6
	GG	0	0	0	0,5 ± 0,7	3	5
	Ictère	0	0	0	0	3,0 ± 4,2	1,0 ± 1,4
	Thymus	0	0,3 ± 0,4	0	0	1,0 ± 1,4	2,5 ± 0,7
	Total	0,3 ± 0,4	0,3 ± 0,4	2	2	28,0 ± 1,4	29,5 ± 0,7
	Nbr de porcs	2	2	2	2	2	2

Tableau 29 : Localisation des lésions observées post-mortem par groupe de porcs.

(moyenne et écarts-type des scores). A) porcs n'ayant pas reçu de virus ; B) porcs ayant été inoculés avec du virus ; GPI : ganglion parotidien du côté de l'inoculation ; GPO : ganglion parotidien du côté opposé ; GA : autres ganglions (ganglion mésentérique, ganglion iliaque, ganglion inguinal et ganglion rétropharyngé).

B. Résultats de l'effet des SGE de tique sur l'infection locale (peau et premier ganglion drainant).

1. Détection du virus dans les organes et plus particulièrement les ganglions parotidiens

À 1 hpi, aucun génome viral n'a été détecté dans les organes lymphoïdes. Inversement, tous les porcs euthanasiés à 5-8 dpi ont présenté un très haut niveau d'ADN viral dans leurs organes lymphoïdes. Les résultats sont plus hétérogènes quand les porcs ont été euthanasiés à 48 hpi. Dans les ganglions lymphatiques parotidiens (Figure 42), la charge virale était plus élevée dans l'essai forte dose de virus que dans l'essai faible dose, pour chaque côté (côté inoculé ou opposé). Cependant, cet effet n'est pas significatif (t test, $df=7$, $t=-1,90$, $p=0,10$). Pour les ganglions parotidiens côté opposé (PLO), aucune différence n'a été observée entre le groupe ID ASFV et le groupe ID ASFV+SGE (Figure 43A, Wald test, $w=0,016$, $df=1$, $p=0,90$). Pour les ganglions parotidiens coté inoculation (PLI), la détection d'ADN viral est significativement inférieure en présence de SGE (Figure 43A, Wald test : $w=4,6$, $df=1$, $p=0,031$). La méthode de marquage par immunofluorescence sur les coupes des biopsies de ganglion parotidien a permis de confirmer que les PLI du groupe ASFV présentent plus de cellules marquées par l'anticorps α -VP72 que le groupe ID ASFV+SGE sur une surface similaire (Figure 43B, 43C). Toutefois, il n'a pas été possible d'identifier si les cellules infectées étaient des cellules dendritiques interdigitalisées ou des LC matures, malgré différents essais de co-marquage (α -VP220/ α -S100 ; S100/ α -SWC3), ni de révéler de différences dans la densité des CPA entre les groupes de porcs avec et sans SGE (Gregg *et al.*, 1995a, Nfon *et al.*, 2008, Bautista *et al.*, 2002). Enfin, en ce qui concerne la détection virale dans la rate et les amygdales, il n'y a pas d'effet visible de la présence de SGE (Figure 44).

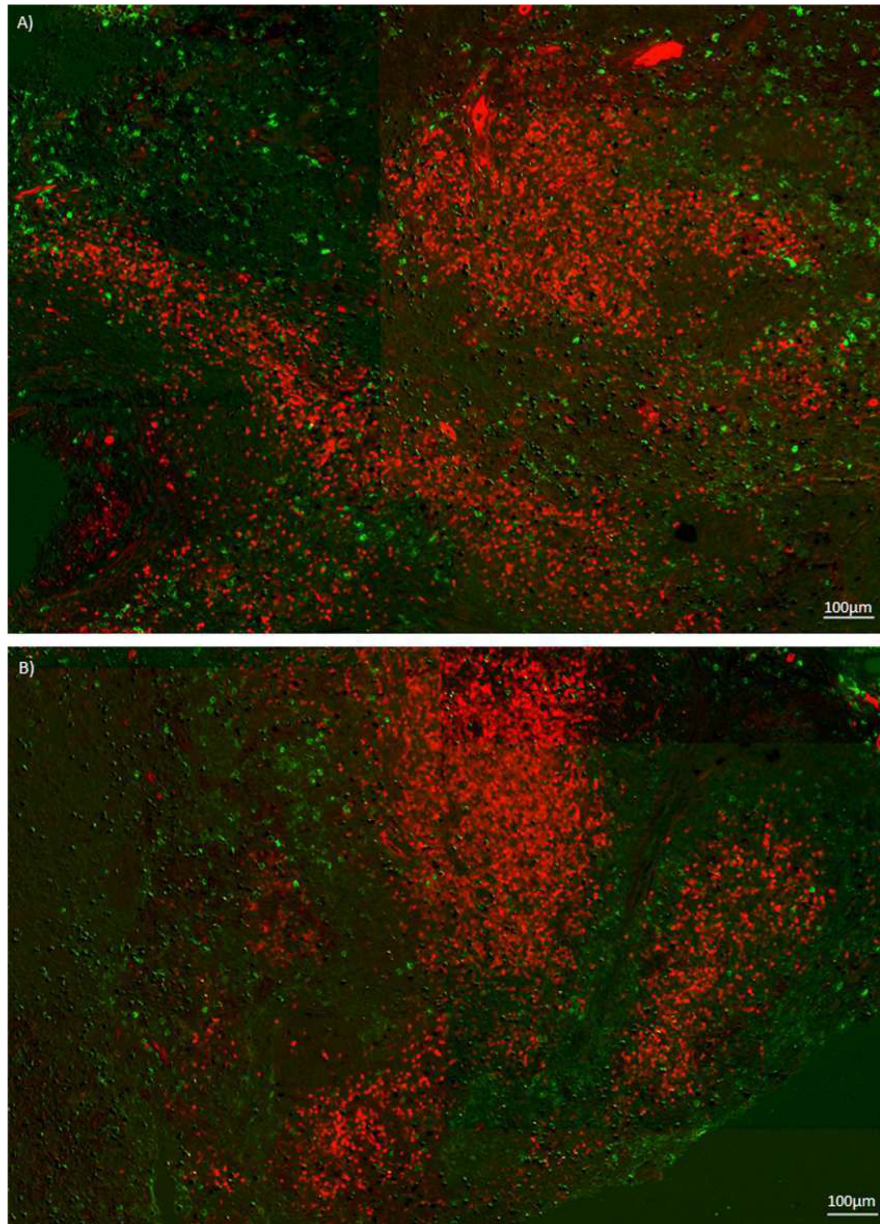


Figure 42 : Coupe histologique de ganglion parotidien du côté de l'inoculation à 48h pi.

A) Ganglions d'un porc du groupe ID ASFV HD +SGE. B) Ganglions d'un porc du groupe ID ASFV HD. Les images sont les superpositions des coupes marquées en rouge par l'anticorps α -S100 et en vert par l'anticorps α -SWC3.

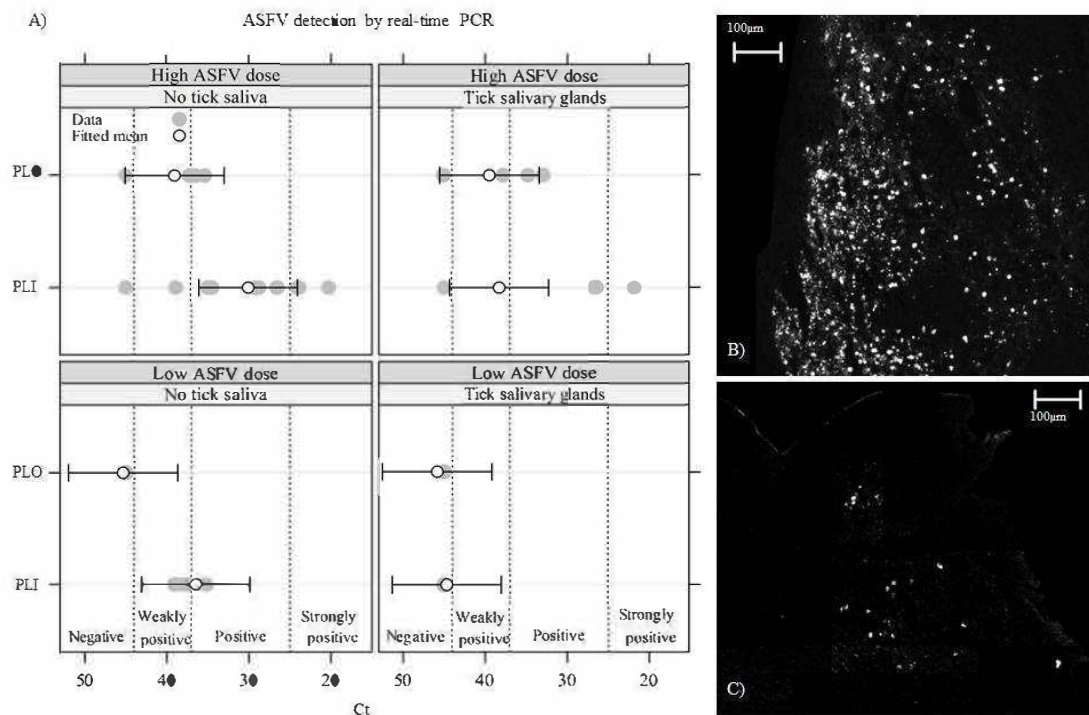


Figure 43 : détection virale dans les ganglions lymphatiques parotidiens à 48 hpi.

A) quantification de l'ADN du virus de la PPA par PCR en Temps Réel. B) Marquage de virus à 48 h pi dans les ganglions lymphatiques parotidien (côté de l'inoculation) pour les porcs recevant seulement une dose élevée de virus de la PPA. C) Marquage du virus à 48 h pi dans les ganglions lymphatiques parotidiens (côté de l'inoculation) pour les porcs recevant une dose élevée de virus de la PPA et d'extrait de glandes salivaires de tiques. PLI : ganglions lymphatiques parotidiens du côté de l'inoculation ; PLO : ganglions parotidiens du côté opposé.

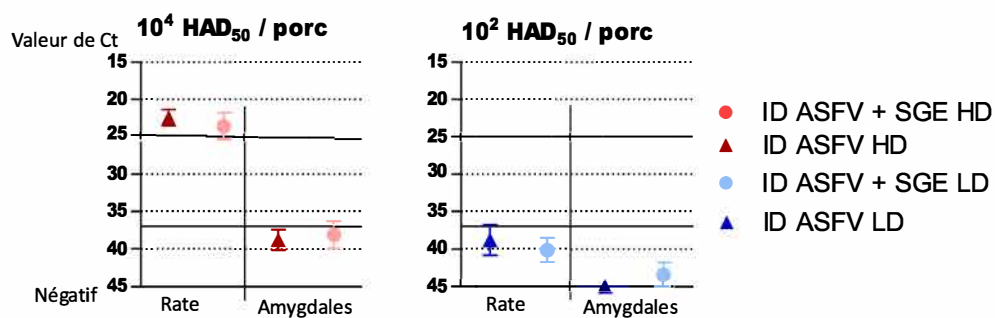


Figure 44 : Détection de l'ADN viral par PCR en Temps Réel dans la rate et les amygdales des porcs inoculés avec du virus.

2. Étendue des lésions cutanées

À 1 hpi, les lésions macroscopiques étaient plus grandes pour le groupe TICK que pour les groupes inoculés, avec un anneau inflammatoire bien caractérisé respectivement de $0,8 \pm 0,2$ (n = 19) et $0,4 \pm 0,1$ (n = 25) mm de diamètre (moyenne \pm écart type) (test t, df = 23,5, t = 6,6, p = 9×10^{-7}). Cette différence est plus frappante à 48 hpi, $1,9 \pm 0,5$ (n = 19) et $0,4 \pm 0,1$ (n = 28) mm de diamètre (test t, df = 19,5, t = 11,9, p = 2×10^{-10}) Figure 45. À la fin de l'expérience, il n'y avait pas plus de lésions macroscopiques, sauf pour les groupes ID ASFV et ID ASFV+SGE, qui présentaient uniquement une pigmentation jaunâtre de la peau.

Cette observation a été partiellement confirmée par le score des lésions. À 1 hpi, le score des lésions par groupes était légèrement différent, avec une valeur moyenne de 17,1 pour le groupe TICK contre 13,3 pour le groupe ID ASFV, 10,0 pour le groupe ID ASFV+SGE et 6,5 pour le groupe ID SGE (Kruskal-Wallis $\chi^2 = 7,3$, df = 3, p = 0,06). À 48 hpi, la valeur moyenne du score des lésions était de 21,7 pour le groupe TICK et 21,6 pour le groupe ID ASFV+SGE, 13,8 pour le groupe ID ASFV, et de 11,0 pour le groupe ID SGE, sans toutefois présenter de différences significatives entre les groupes (Kruskal-Wallis $\chi^2 = 3,8$, df = 3, p = 0,28). De 5 dpi à 8 dpi, le score de lésions était de 22,8 pour le groupe ID ASFV et 17,3 pour le groupe ID AFSV+SGE, alors qu'il a diminué à 12,0 pour le groupe TICK (pas de résultats pour le groupe ID SGE) et affiche une différence presque significative (Kruskal-Wallis $\chi^2 = 5,4$, df = 2, p = 0,06).

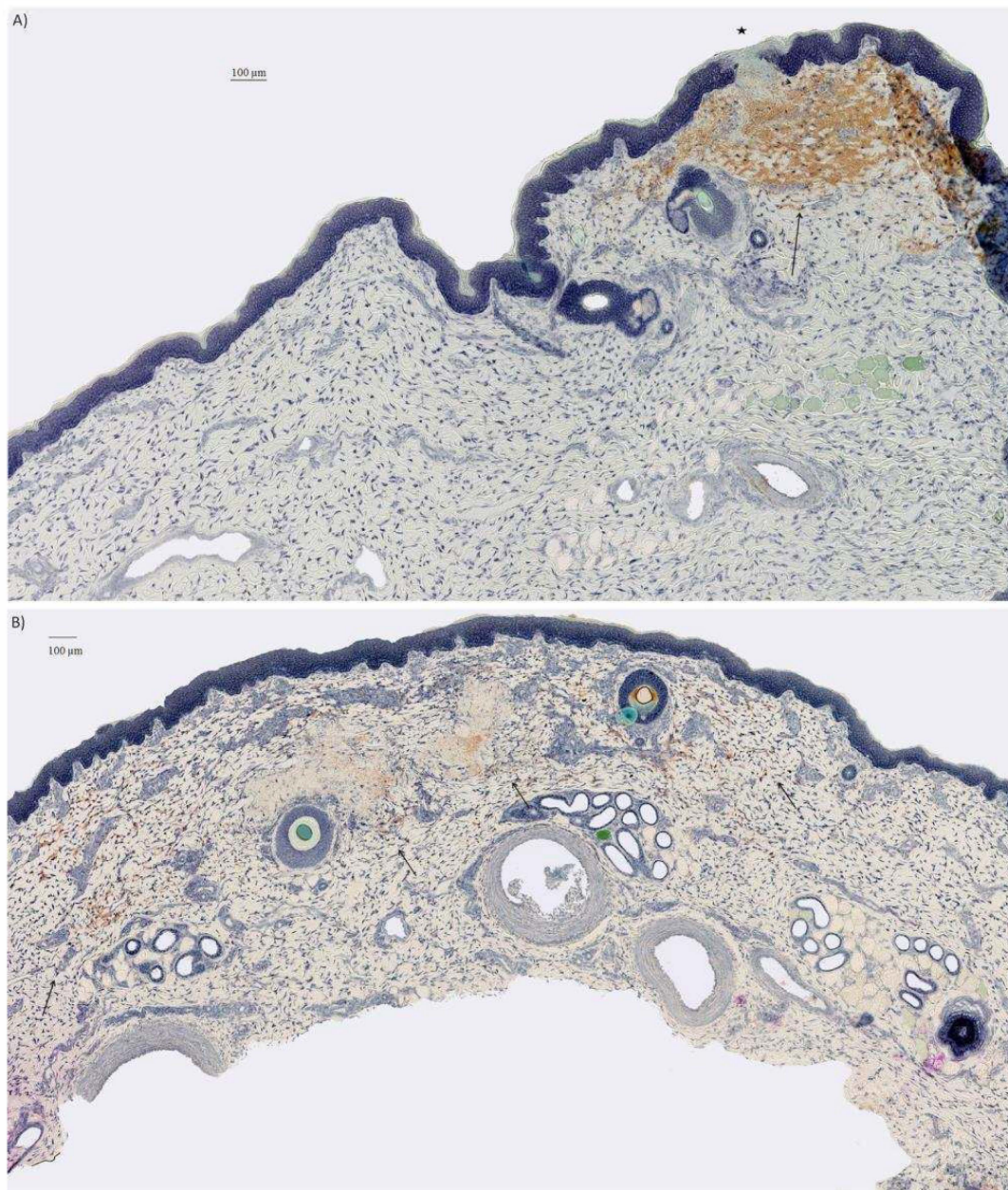


Figure 45 Coupe histologique de peau mordue par une tique.

A) : 1h, l'étoile montre le point de la morsure et la flèche l'étendue de la zone hémorragique. B) : morsure à 48h, les flèches montrent l'étendue de la zone hémorragique et des lésions dermiques. Coloration par le kit Hemacolor.

3. Mastocytes de la peau

Outre les macrophages et les LC qui sont les cellules cibles du virus et qui jouent un rôle primordial dans la réponse immune précoce, les mastocytes (sous-population de granulocytes) ont aussi été évalués en raison de leur rôle dans l'activation de l'inflammation et de l'immunité innée. Le comptage de ces cellules a été réalisé sur toute la surface des coupes par discrimination morphologique. Elles sont en effet marquées en rose foncé avec un cytoplasme plus clair par coloration Hemacolor® (Figure 46A), et sont repérables grâce à leur taille, l'observation de nombreuses granules et d'un noyau plurilobé (Figure 46B et C).

Leur dénombrement sur l'ensemble des coupes histologiques ne montre pas de tendance particulière entre 1 h et 48 h pi, quel que soit le groupe de porcs étudié (Figure 47). Seuls les porcs du groupe Control, qui n'ont subi aucun stress, présentent une moyenne de mastocytes inférieure aux autres groupes de porcs. Trois groupes présentent un nombre moyen de mastocytes un peu supérieur. Les groupes entourés en rouge dans la Figure 47 font partie d'une même fratrie, il est donc possible qu'un facteur génétique prédispose ces porcs à avoir un taux de mastocytes supérieur. Quand au groupe TICK à 1h (flèche rouge de la Figure 47), il présente une moyenne supérieure, mais aussi un très fort écart-type. Il est possible que cela provienne du stress plus important que ces porcs ont subi lors de la morsure de tiques puisqu'ils retrouvent ensuite un niveau basal à 48h.

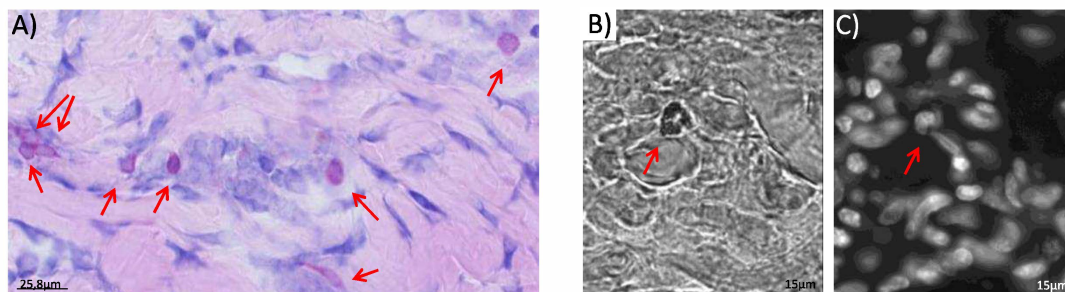


Figure 46 : Coupe de peau d'oreille de porc présentant des mastocytes.

A) coloration par le kit Hemacolor®, les mastocytes sont les cellules rose foncé, elles se retrouvent localisées dans les vaisseaux sanguins colorés en bleu/violet ; B) Photographie en noir et blanc prise par un objectif à immersion x60, les granules de la cellule sont parfaitement visibles. C) Photographie avec un filtre DAPI de la même section que B) représentant les noyaux des cellules, on peut voir le noyau plurilobé de la cellule.

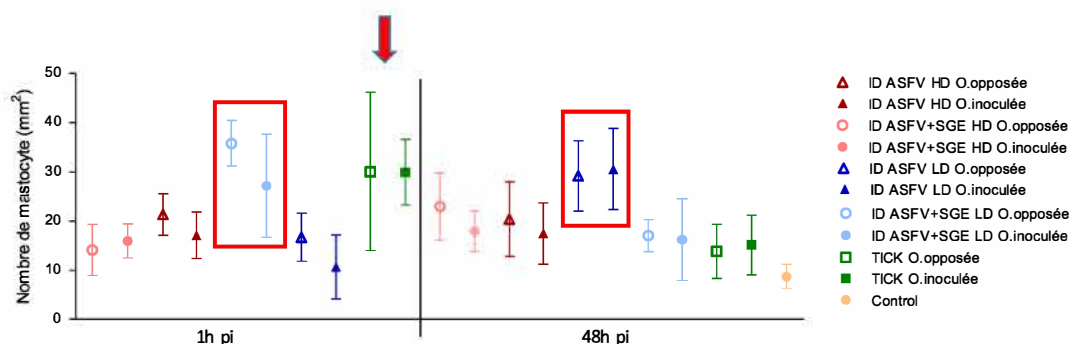


Figure 47 : Densité de mastocytes comptabilisés sur toute la surface des biopsies à 1h et 48 hpi.

O. opposée : Oreille opposée ; O. inoculée : oreille inoculée. Les rectangles rouges montrent les groupes de porcs appartenant exactement à la même fratrie. La flèche indique le groupe TICK à 1h. HD : Essai haute dose ; LD : Essai faible dose.

4. Cellules myéloïdes de la peau

Un marquage généraliste préliminaire a été réalisé avec l'anticorps α -CD14. Ce marquage a permis de montrer une répartition très homogène des cellules marquées (polymorphonucléaire, monocytes et macrophages), avec une intensité des cellules plus importante dans le derme profond que dans le derme (Figure 48). Dans les zones lésées par l'inoculation ou le gorgement des tiques, les cellules marquées sont plus petites et plus rondes correspondant certainement à un afflux de monocytes-macrophages dans les zones hémorragiques. Contrairement au marquage spécifique ciblant les macrophages décrit après, ce marquage généraliste n'a pas permis de mettre en évidence une différence de densité de cellules dans les zones d'intérêt entre groupes de porcs.

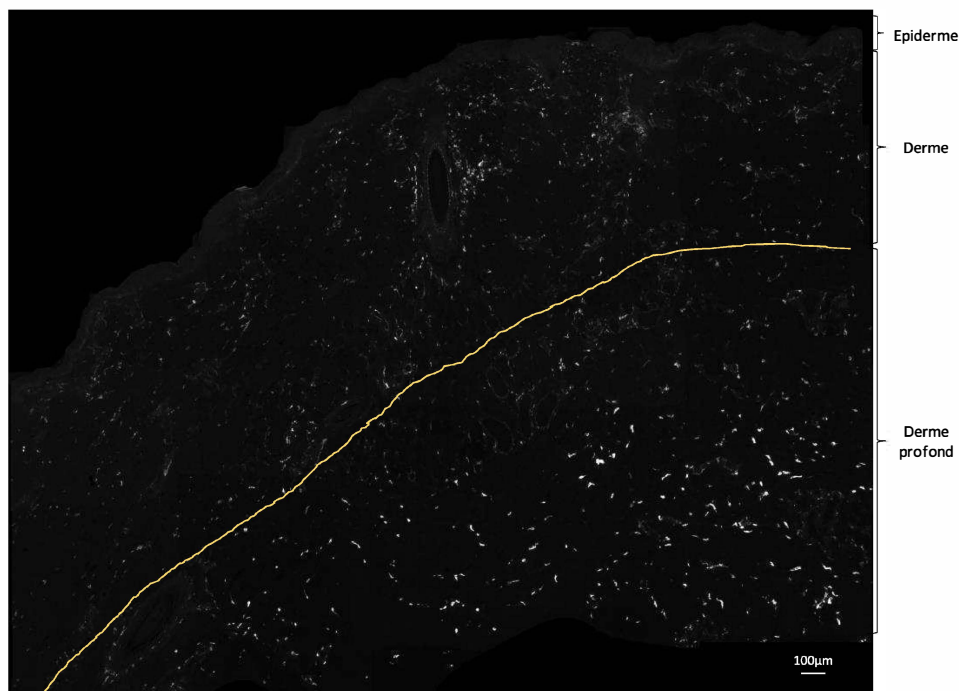


Figure 48 : Coupe histologique de la biopsie d'inoculation intradermique d'un porc du groupe ID ASFV + SGE de l'essai LD marquée par un anticorps α -CD14.

5. Densité des cellules de Langerhans

Dans un second temps, un marquage par l'anticorps α -SWC3 a permis de discriminer les LC de l'épiderme. Les analyses préliminaires n'ont révélé aucune différence dans la densité des cellules de Langerhans entre les morsures de tiques ou l'inoculation de SGE. Ces deux groupes de porcs ont donc été regroupés dans une catégorie « salive de tique » (Tick saliva). Les principaux résultats sont représentés sur les Figures 49, 50 et 51.

À 1 hpi, des changements dans la densité de LC sont surtout liés aux types de perturbations, (Figure 49A), indépendamment du traitement avec ou sans ajout de virus ou de salive et sans différence significative de la densité de LC : Figure 50, simulation de Monte Carlo, $B = 1,999$, $p > 0,05$.

À 48 hpi, la plupart des coupes montrant une diminution de la densité de LC provenaient d'animaux ayant reçus de la salive de tiques (ID ASFV+SGE, ID SGE, TICK) : Figure 49B. Ils ont permis de mettre en évidence une réapparition progressive des LC de part et d'autres de la morsure de tiques (Figure 51). Les coupes présentant la plus forte baisse (32/44) ont été classées dans les classes « scab » ou « physiological ». Les coupes montrant une augmentation ont pour la plupart été prélevées sur des porcs recevant seulement du virus de la PPA (Figure 49B). La plupart avait été classée dans la catégorie "Deep" (16/24). Les résultats du modèle linéaire robuste ont montré une interaction significative entre la salive de la tique et le temps (48 hpi) : simulation de Monte Carlo, $B = 1,999$, $p = 0,006$. Comme le montre la Figure 50, la présence de salive a diminué significativement la densité des LC pour toutes les doses de virus de la PPA (y compris sans virus) : colonne de droite, simulation de Monte Carlo, $B = 1,999$, $p < 0,05$. Pour les porcs ne recevant pas de salive de la tique (Figure 50, colonne de gauche), la présence de virus de la PPA a eu tendance à augmenter la densité de LC, avec une densité plus élevée pour la forte dose de virus de la PPA. Cependant, cet effet n'est pas significatif (simulation de Monte Carlo, $B = 1,999$, $p > 0,05$).

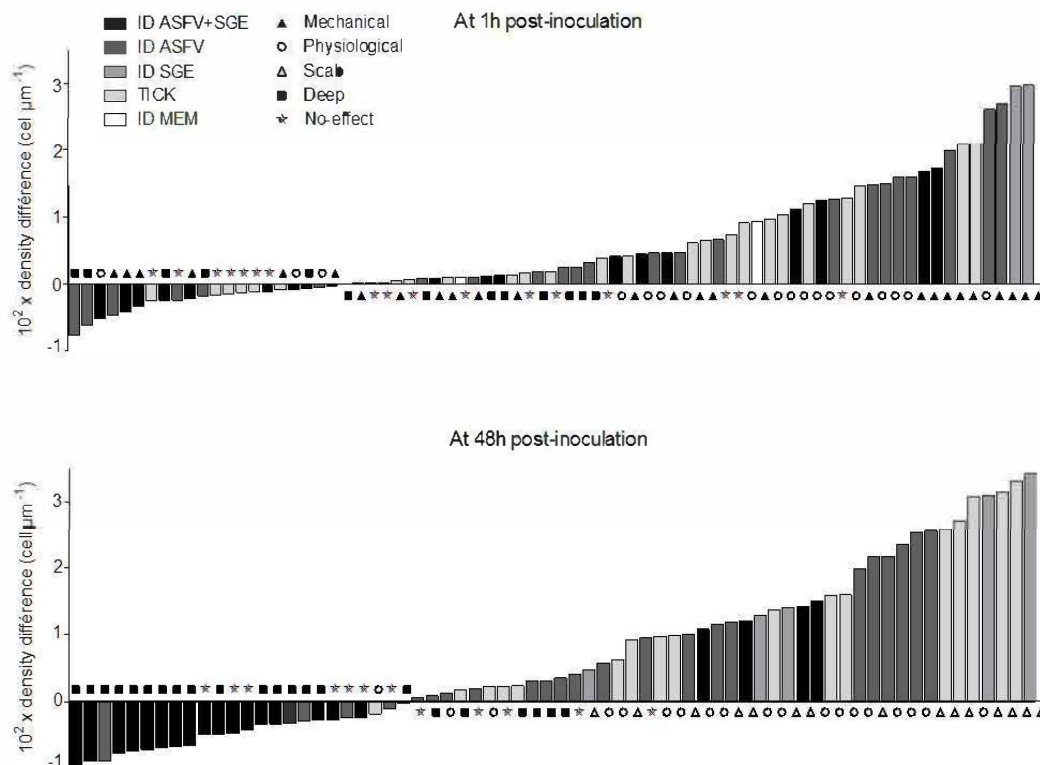


Figure 49 : Classification des biopsies par différences de densité des cellules de Langerhans associées au modèle de lésions histologiques.

A) Classification des biopsies à 1 hpi. B) Classification des biopsies à 48 hpi. Les résultats de comptage manuel et l'observation ont été effectués sur chaque coupe. Deux motifs principaux de lésions ont été observés, l'un dû à la morsure de tique ou à l'inoculation intradermique (modèle : mechanical ou deep) et l'autre en raison de l'effet physiologique de la salive, des SGE et du virus (modèle : no effect, physiological ou scab). Un résultat positif signifie un déficit de cellule au contraire, un résultat négatif signifie un recrutement de cellule

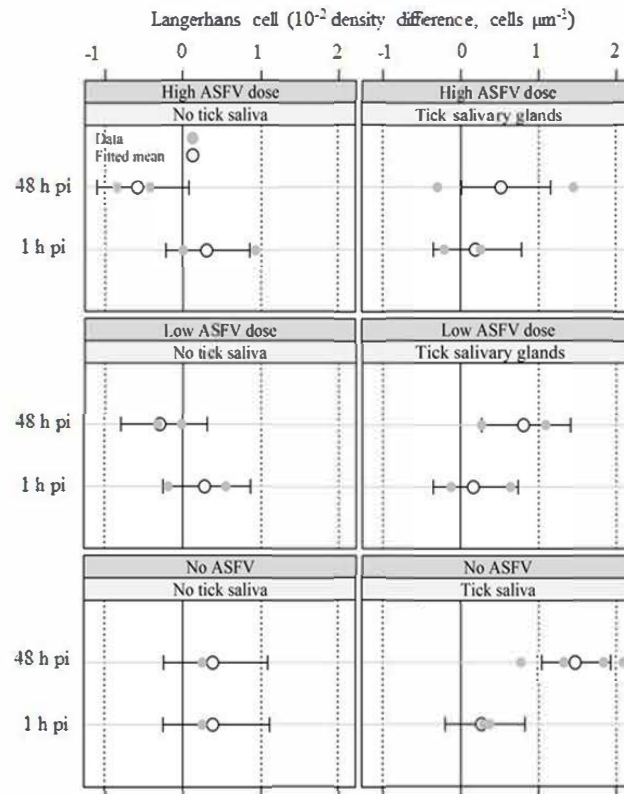


Figure 50 : Patron de la différence de densité des cellules de Langerhans entre l'oreille inoculée et l'oreille opposée.

La moyenne a été ajustée avec un modèle linéaire robuste.

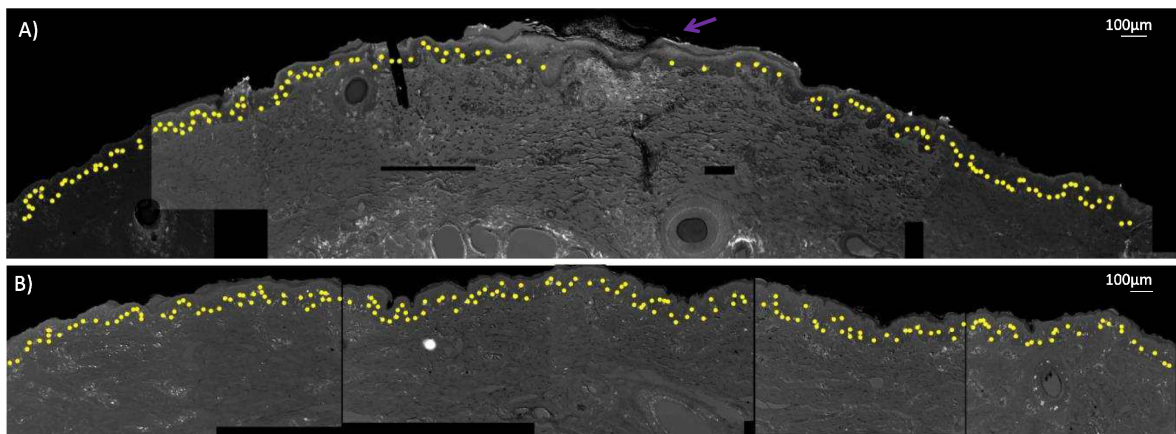


Figure 51 : biopsies de peau de porc mordu par une tique à 48 hpi.

Les biopsies sont marquées avec l'anticorps anti- α -SWC3. La morsure est indiquée par la flèche violette, Les points jaunes sont superposés aux cellules de Langerhans ; A) biopsie de la morsure de tique, B) biopsie de l'oreille opposée.

6. Recrutement macrophagique

L'identification des macrophages a pu être réalisée suite à un double marquage par des anticorps α -SWC3 et α -CD136.

En dehors des zones lésées, la densité des macrophages, comptabilisés dans des rectangles de même surface, montre qu'il y a significativement plus de macrophages dans le derme que dans le derme profond (Figure 52). Cette répartition est cohérente avec les risques liés à l'introduction de parasites plus important près de la surface de la peau. Elle est aussi cohérente avec la structuration morphologique de la peau et la présence de vaisseaux sanguins plus nombreux dans le derme. Toujours en dehors des zones lésées, la densité des macrophages a aussi été comparée, entre les groupes de porcs. Les résultats montrent qu'à 1h pi, seul le groupe TICK présente une densité macrophagique significativement supérieure à celle du groupe Control (Figure 53). Cela pourrait indiquer que la salive de tique a un rayon d'action relativement important en dehors de la zone des tissus lésés. Le fait que le groupe ID SGE ne présente pas la même tendance n'est pas forcément contradictoire. En effet, l'inoculation de SGE à la seringue est brève, alors que la formation des lésions par la morsure de tique prend plus de temps. Lors du gorgement, les tiques alternent entre salivation et prise de sang. Cette interaction entre la tique et le système immunitaire de l'hôte est donc bien plus importante et pourrait expliquer une diffusion plus importante de la salive que des SGE en dehors des zones lésées. Il est aussi possible que cette différence entre le groupe TICK et ID SGE proviennent du temps passé entre la pose des tiques, l'inoculation à la seringue et le prélèvement de la biopsie. Le temps écoulé entre l'inoculation à la seringue et le prélèvement des biopsies est d'environ 1h30, alors que le temps de pose de la boîte de Petri contenant les tiques pouvait atteindre 4h30 jusqu'au prélèvement de la biopsie. Et si les tiques se sont rapidement gorgées alors la réponse immunitaire du porc a pu commencer environ 3h avant le prélèvement de la biopsie.

Les résultats observés à 48h montrent que le groupe TICK ne présente plus de différence vis-à-vis du groupe Control, probablement grâce à l'action du système immunitaire de l'hôte et à la cicatrisation des tissus. Les porcs des groupes inoculés par une faible dose de virus montrent quant à eux une augmentation de la densité de macrophages dans les rectangles ; cette augmentation est significativement différente seulement pour le groupe ID ASFV + SGE de l'essai LD par rapport au groupe Control.

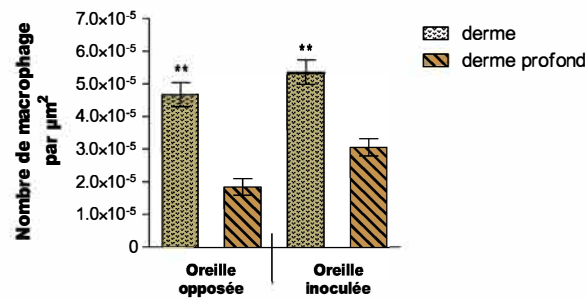


Figure 52 : Moyenne de la densité de macrophages dans les rectangles du derme et du derme profond sur la totalité des groupes de porcs.

Test de Wilcoxon : ** $p > 0,01$ entre le derme et le derme profond.

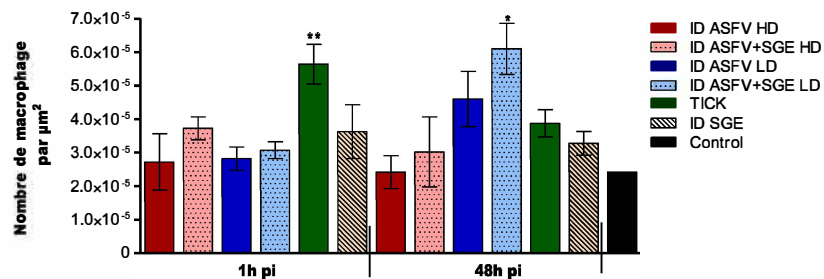


Figure 53 : Moyenne de la densité de macrophages des rectangles (derme et derme profond) par groupes de porcs.

Test de Wilcoxon : * $p > 0,05$; ** $p > 0,01$ par rapport au groupe Control. HD : essai haute dose ; LD : essai faible dose.

Cependant, en ce qui concerne les zones lésées, l'observation des biopsies permet de repérer un afflux massif de cellules marquées α -SWC3, correspondant probablement à un afflux de leucocytes en lien avec le phénomène d'hémostase et de réponse immune précoce. Sur les biopsies des morsures de tique, on distingue ainsi deux zones à 1h et parfois encore à 48 hpi (Figure 54) :

- Une première petite zone hémorragique relativement ronde exempte de tissus et de collagène. Comme on peut le voir sur la Figure 54, cette zone est presque totalement exempte de macrophages.
- Une seconde zone plus large, délimitée par les flèches rouges, est constituée de tissus lésés par l'action de la salive. Cette zone est toujours observée à 1h et à 48h pi. De plus, lors d'inoculation intradermique à la seringue, seule cette zone est visible (Figure 54 et 55). C'est pourquoi la comparaison de la densité de macrophages entre les groupes de porcs a été réalisée par la suite sur cette zone de lésion plus large.

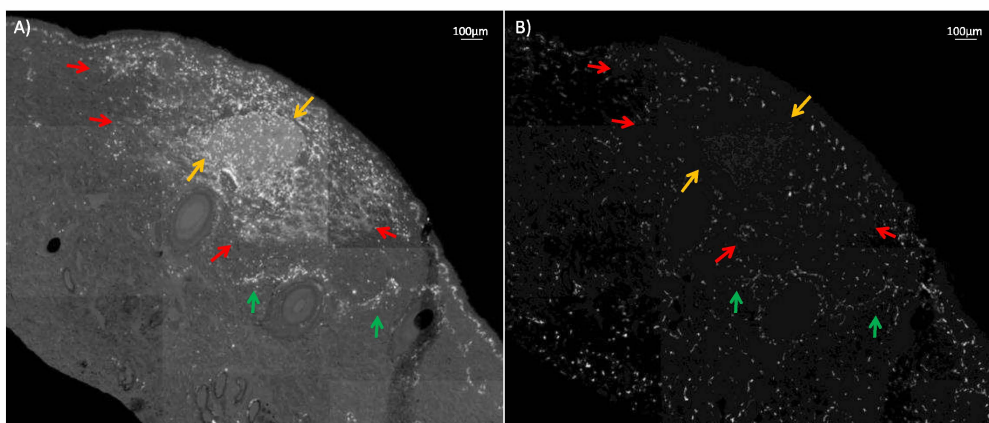


Figure 54 : Biopsies de peau de porc mordu par une tique à 1h pi marquées.

A) α -SWC3 et B) α -CD163. Les flèches jaunes indiquent une zone arrondie sans tissu, avec un afflux hémorragique, seules des cellules marquées α -SWC3 y sont présentes. Les flèches rouges indiquent la zone de tissus lésés par la morsure avec la présence de cellules mono- et co-marquées α -SWC3/ α -CD163. Les flèches vertes identifient des vaisseaux dans les tissus sains à proximité immédiate des zones lésées. On peut y voir un afflux de cellules mono- et co-marquées dans ces vaisseaux.

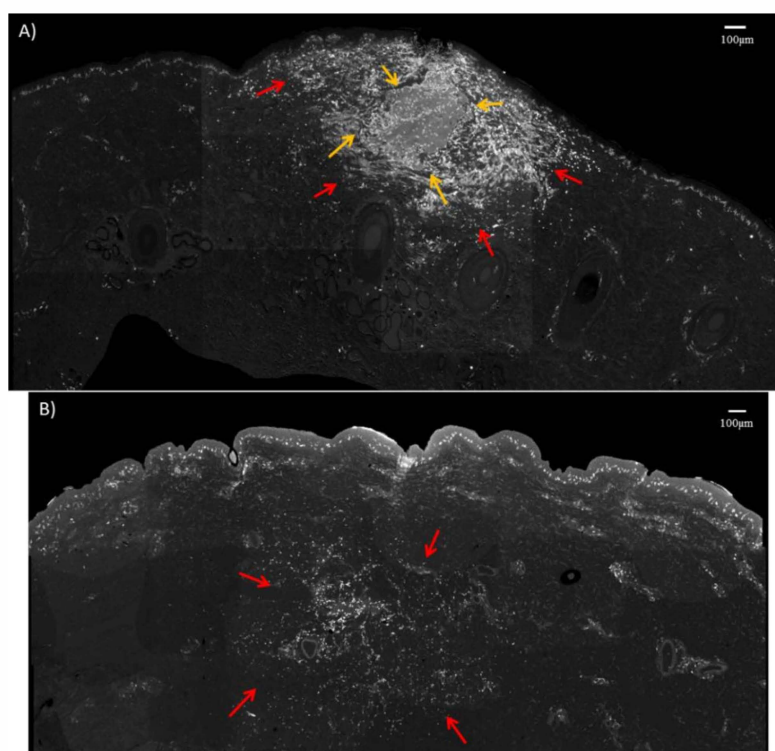


Figure 55 : Effet de la morsure de tique et de l'inoculation à 1h sur l'oreille de porc.

A) Morsure de tique. B) Inoculation intradermique. La profondeur des morsures de tique maximum de 550,0 μm (n=14 biopsies sur 7 porcs) alors que celle d'une inoculation est de $1052,8 \pm 511,4 \mu\text{m}$ (n=23 biopsies sur 14 porcs).

Les observations de morsures de tiques et d'inoculations de SGE sans virus ont aussi été regroupées en un seul groupe « Tick saliva » (salive de tique) suites aux analyses préliminaires. La densité de macrophages estimée par le modèle linéaire robuste n'a pas montré de recrutement macrophagique à 1 hpi dans aucun des groupes de porcs étudiés (simulation de Monte Carlo, $B = 1,999$, $p > 0,05$), à l'exception des porcs recevant seulement de la salive de tique (Figure 56). Par contre, à 48 hpi, les résultats ont montré une interaction forte et significative entre la faible dose de virus et le temps (simulation de Monte Carlo, $B = 1,999$, $p = 0,01$). De plus, l'interaction entre la salive et le temps est significative (simulation de Monte Carlo, $B = 1,999$, $p = 0,03$). Au final, tous les groupes de porcs recevant du virus de la PPA et / ou de la salive de tique ont montré un recrutement significatif des macrophages, à l'exception du groupe de porcs traités avec une forte dose de virus de la PPA sans salive de tiques (Figure 56, colonne de gauche : Simulation de Monte Carlo, $B = 1,999$, $p > 0,05$). Le groupe de porcs témoin n'ayant pas reçu ni du virus de la PPA, ni de la salive de tique ne montre pas de recrutement des macrophages (Figure 56, colonne de gauche : Simulation de Monte Carlo, $B = 1,999$, $p > 0,05$).

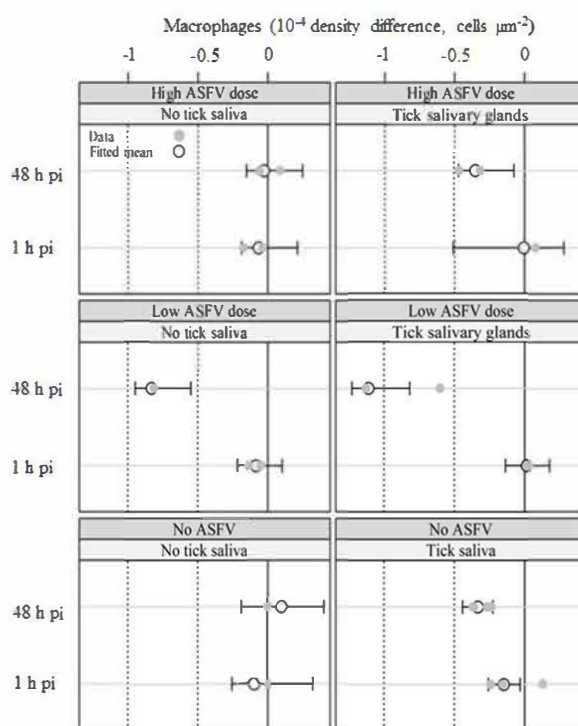


Figure 56 : Différence de densité macrophagique entre l'oreille inoculée et l'oreille opposée. La moyenne a été ajustée avec un modèle linéaire robuste.

7. Détection du virus

Le virus a également été recherché dans les biopsies à travers un marquage par des anticorps α -VP72. Seules les biopsies de l'essai HD ont pu être exploitées. À 1h pi, quel que soit le groupe inoculé, aucune cellule marquée n'a pu être identifiée. À 48h pi, la densité de cellules marquées, et donc de cellule infectées est supérieure dans les biopsies du groupe ID ASFV + SGE par rapport aux biopsies du groupe ID ASFV, phénomène qui concorde avec le recrutement macrophagique observé en présence de molécule de salive. Toutefois, cette différence n'est pas significative (Wilcoxon rank sum test, $p = 0,34$) (Figure 57) et peut être due à un échantillonnage trop faible. Ces résultats sont en contradiction avec ceux observés dans les ganglions parotidiens où, suite à la co-inoculation de SGE et de virus, on remarque un déficit significatif de cellules infectées. Ici encore, le pouvoir immunomodulateur des molécules de salive de tique peut être souligné. D'un côté la présence de molécules de salive favorise localement le recrutement des macrophages et probablement aussi leur infection par le virus et d'un autre côté, elle inhibe la présentation des antigènes viraux dans les premiers ganglions lymphatiques drainants.

Grâce à la réalisation des coupes en série, et malgré l'absence de double marquage, il a aussi été possible de confirmer que les zones de cellules infectées par le virus correspondent parfaitement avec les zones de recrutement macrophagique dans toutes les biopsies concernées (Figure 58). Ce constat permet de renforcer l'hypothèse de l'effet activateur des molécules de salive sur la transmission du virus au porc et sa multiplication en favorisant le recrutement de ses cellules cibles.

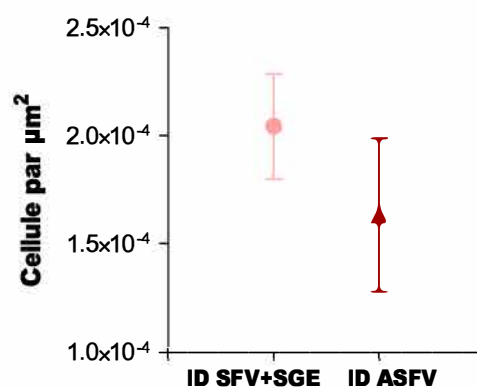


Figure 57 : Moyenne de densité de cellules infectées par le virus de la PPA dans les biopsies d'oreilles des porcs de l'essai haute dose à 48h pi.

Comptage réalisé sur 2 à 4 coupes d'une biopsie par porc, moyenne sur 2 porcs par groupe.

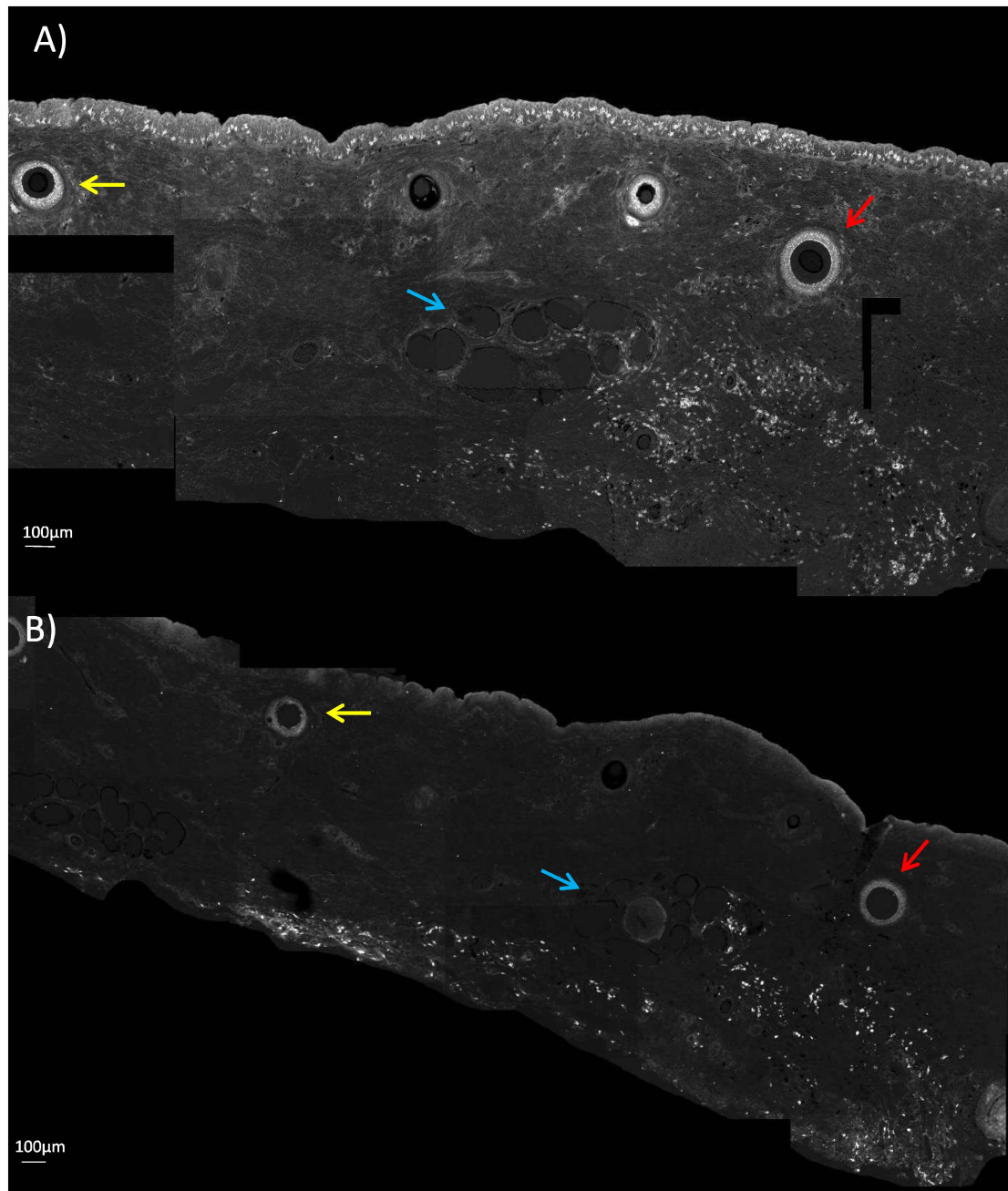


Figure 58 : Biopsies de peau d'oreille d'un porc ID ASFV + SGE de l'essai HD à 48h pi.

A) marquage par un anticorps panmyéloïde α -SWC3 ; B) marquage par un anticorps α -VP72 pour la reconnaissance de cellules infectées. La distance séparant la coupe A) de la coupe B) est de 48 μ m. Les flèches de couleurs identifient 3 structures morphologiques qui se retrouvent sur les 2 coupes, les flèches jaunes et rouges correspondent à des vaisseaux et les flèches bleues à des glandes sébacées.

V. Discussion du chapitre 3

Cette étude originale est la première à explorer *in vivo* le modèle tripartite « tique *Ornithodoros*-virus de la PPA-porc domestique » aux échelles systémique et locale. C'est aussi la première à évaluer l'effet de la salive de tique sur la réponse immune du porc dans le cadre d'une infection par le virus de la PPA et à décrire une morsure de tique molle dans de la peau de porc. Pour se rapprocher au mieux des conditions naturelles de contamination par morsure de tique, nous avons sélectionné un couple de tique (*O. porcinus*) et d'isolat viral récoltés sur une zone géographique restreinte de l'île de Madagascar, ainsi que la voie intradermique pour l'administration de l'inoculum. De même, la dose de 10^4 HAD₅₀/ml classiquement utilisée pour l'évaluation de l'efficacité de candidats-vaccins vis-à-vis de la PPA chez le porc (King *et al.*, 2011) a été comparée à une dose plus faible de 10^2 HAD₅₀/ml, présumée plus proche de la quantité de virus potentiellement sécrétée par la tique (Kleiboeker *et al.*, 1998).

Lors de la morsure, la tique sécrète des protéines et molécules du sialome dans la blessure. Pour mimer ce phénomène physiologique, nous avons préparé des extraits de glandes salivaires d'*O. porcinus*. Les SGE sont réputés plus immunogènes que la salive de tique. Pour minimiser cette différence, nous avons choisi *a priori* d'utiliser l'équivalent d'une glande salivaire pour mimer l'effet de la morsure de deux tiques. L'étude de (Mans *et al.*, 2008) a montré que le ratio entre protéines de salive et protéines de glande salivaire était plus équilibré chez les tiques molles que chez les tiques dures. Ce choix est conforté par nos résultats expérimentaux où l'on constate que les lésions dermiques provoquées par l'inoculation de SGE seuls sont moindres que celles induites par la morsure de tique, et que les patrons de recrutement des LC et des macrophages sont les mêmes entre les groupes SGE et TICK.

Par ailleurs, l'utilisation de salive nécessite le recours à des produits chimiques pour stimuler la salivation des tiques, principalement de la pilocarpine, produits qui peuvent se retrouver récoltés dans la salive à des concentrations non négligeables (Ribeiro *et al.*, 2004). De plus, ces tampons ne provoquent pas une salivation totalement naturelle puisque les tiques ne sécrètent pas de manière homogène les mêmes protéines au court du temps. Il existe plusieurs phases de gorgement, bien décrites et difficiles à reproduire artificiellement (Chmelar *et al.*, 2012).

Le second biais, à considérer lors de toute étude histologique, est le mode d'administration à la seringue. La profondeur d'inoculation comme nous l'avons vu dans notre essai, ainsi que les volumes et concentrations inoculés restent relativement éloignés de la réalité (Frischknecht, 2007). De plus, le virus produit sur macrophages de porcs n'a pas subi

les pressions de sélection que peut entraîner son passage à travers les différentes barrières tissulaires des tiques, en particulier de l'intestin et des glandes salivaires. Toutefois, nous avons pu constater que malgré ces conditions, l'effet du virus d'une part et l'effet des SGE d'autre part sont assez puissants pour être observables et quantifiables au point d'inoculation sur des coupes histologiques comme au plan physiologique chez le porc.

A. Effet de la dose virale sur le délai de mise en place de la réponse immunologique et symptomatologique du porc

La symptomatologie observée chez les porcs est comparable à celle décrite dans l'infection par le virus de la PPA (Blome *et al.*, 2013, Galindo-Cardiel *et al.*, 2013), et ce quelle que soit la dose ou l'adjonction d'extrait de glandes salivaires. La veille du début de l'hyperthermie, symptôme caractéristique de la maladie séparant la période d'incubation du déclenchement de maladie (Beltran Alcrudo *et al.*, 2008, Greig & Plowright, 1970), une perte d'appétit des animaux est observable ainsi qu'une détection du virus dans la circulation sanguine et la rate, ainsi qu'une augmentation du niveau de certaines cytokines sériques (TNF- α , INF- α , IL-12). Puis une leucopénie, associée à une augmentation du niveau de la cytokine IL-6, accompagne l'hyperthermie. Les jours suivants, l'évolution de la maladie (anorexie, diarrhée, érythème cutané et jaunisse) est semblable aux études comparatives sur la voie d'inoculation du virus (intramusculaire versus oro-nasale) (Howey *et al.*, 2013). La souche virale d'origine malgache présente donc un patron d'infection similaire à celui décrit avec la souche géorgienne, très proche phylogénétiquement et précédemment utilisée dans des infections expérimentales (Guinat *et al.*, 2014, Michaud *et al.*, 2013).

Dans ce cadre expérimental, les résultats obtenus montrent une corrélation entre la quantité de virus inoculé et la chronologie des effets observés, avec un retard d'une journée dans les réponses immunologiques et symptomatologiques de l'essai LD versus l'essai HD comme précédemment décrits (Howey *et al.*, 2013, de Carvalho Ferreira *et al.*, 2013). A 48h pi, la quantité de virus détecté dans le sang, les organes et les biopsies de peaux est plus faible dans l'essai LD, indiquant aussi un retard dans la réplication virale.

Le dernier résultat imputable à la dose de virus inoculée est la différence de densité de macrophages détectée dans les biopsies de peau au point d'inoculation à 48h pi. La disparition locale des macrophages est probablement due à la mort de ces cellules. Le virus est en effet capable d'activer de manière tardive, via la protéine de caspase-3, l'apoptose des cellules entre 24 et 48h après l'infection, permettant une dissémination massive du virus (Alonso *et al.*, 2013, Sanchez *et al.*, 2013). Il est possible que les biopsies analysées à 48h pi aient été

réalisées au moment de cette première et intense phase de dissémination du virus. Une seconde hypothèse relève de la cinétique de maturation des macrophages. Une fois stimulé par sa rencontre avec un agent pathogène, le macrophage subit des changements profonds (Alonso *et al.*, 2013, Rutherford *et al.*, 1993). L'anticorps α -SWC3 est un marqueur myélomonocytaire porcin utilisé, également dans notre étude, pour détecter les macrophages (Gregg *et al.*, 1995a, Piriou-Guzylack & Salmon, 2008). C'est un homologue de l'épitope SIRP- α (Ezquerro *et al.*, 2009), dont l'expression est régulée en fonction de la maturation des macrophages (Barclay, 2009, Kong *et al.*, 2007). Or une forte dose de virus peut influencer la maturation des LC et des macrophages à 48h pi (Salguero *et al.*, 2005) et induire une extinction du signal SIRP- α pouvant réduire la détection de ces cellules dans nos échantillons.

B. La présence de SGE module la réponse immune du porc

1. Les SGE seuls ne modulent pas les réponses physiologiques ni immunologiques générales du porc

Le groupe de porcs ayant reçu une inoculation intradermique de SGE sans virus présente des résultats similaires à ceux provenant du groupe TICK, que ce soit sur les réponses immunitaires ou physiologiques. Aucun symptôme n'est déclenché en absence de virus et sous la simple action des SGE : pas de signes cliniques, pas d'hyperthermie, pas de modification du taux de cytokine.

2. Les SGE en présence de virus amplifient la fièvre

Lorsque les porcs sont inoculés avec le virus et ce quelle que soit la dose, la présence de SGE va augmenter l'amplitude de l'hyperthermie alors qu'ils n'influencent pas le niveau systémique des cytokines pro-inflammatoires, TNF- α et IL-6. La piste des substances pyrogènes ne semble donc pas expliquer cette différence, mais reste à approfondir, même si à l'heure actuelle les mécanismes de déclenchement de la fièvre sont encore très mal connus (Owen *et al.*, 2013).

3. Les SGE ont un effet immunomodulateur sur les lésions tissulaires de la peau

D'une manière générale, on connaît encore peu de choses sur la physiologie de la morsure de tiques molles ainsi que sur leur salive. Les quelques études qui ont été faites se sont portées sur *O. savignyi*, *O. parkeri* et *O. moubata*. L'utilisation de SGE d'*O. porcinus* est donc un nouveau modèle. Cependant, les lésions provoquées par la morsure d'*O. porcinus* sont assez similaires à celles observées chez les cochons d'inde suite à une morsure d'*O. moubata* (Lavoipierre & Riek, 1954, Riek & Lavoipierre, 1954). Les lésions tissulaires sont caractérisées par un point hémorragique plus ou moins diffus dans les tissus cutanés à 1h, plus marqué à 48h, et cicatrisant rapidement en quelques jours. Toutes les espèces de tiques molles ne provoquent pas ce type de lésion, par exemple, les morsures d'*O. erraticus* provoquent d'importants dommages, avec des hémorragies relativement circulaires à l'endroit de la morsure et qui s'étendent de façon importante encore après 24h pour se transformer en ulcère. Ainsi, en plus d'être proches phylogénétiquement avec des modes de vie très similaires (Vial, 2009), nous savons maintenant que *O. moubata* et *O. porcinus* provoquent le même type de lésions tissulaires lors du gorgement. Il est donc tout à fait possible que les tiques *O. porcinus* possèdent le même type de molécules impliquées dans les réponses anti-hémostatiques, anti-complément et anti-inflammatoires que celles décrites chez *O. moubata* (Nunn *et al.*, 2005, Barratt-Due *et al.*, 2011, Diaz-Martin *et al.*, 2015).

Lors du gorgement, qui dure entre 15 et 60 minutes, la tique entretient par la salive, une voie de communication vers l'extérieur, plus importante qu'une inoculation intradermique rapide de quelques secondes (Vial, 2009). Cette différence explique en partie les résultats d'observations des lésions à 1h pi pour lesquels le groupe TICK présente un score de lésions supérieur à celui du groupe ID SGE, tendance qui est confirmée à 48h pi. En cas d'inoculation du mélange virus + SGE, à 48h pi le score des lésions devient alors équivalent à celui du groupe TICK, montrant un effet plus immunomodulateur des SGE en présence de virus. Ce mécanisme est probablement à mettre en lien avec l'observation d'hyperthermies plus importantes chez les groupes de porcs malades avec SGE. Pour évaluer les scores des biopsies à la fin de l'expérience (5 à 8 jours pi), il faut rappeler que les principaux symptômes du virus de la PPA se traduisent par des fièvres hémorragiques fulgurantes. Ainsi, le niveau des lésions du groupe ID ASFV plus important par rapport à celui du groupe ID ASFV + SGE devient cohérent avec la multiplication importante du virus au cours du temps et de ses conséquences physiologiques. La modulation apportée par les SGE pourrait cependant permettre au système immunitaire de l'hôte de temporiser la dégradation de ces tissus par le virus. En effet, la majorité des molécules de salive permet aux tiques de moduler l'hémostase de leur hôte (Chmelar *et al.*, 2012) et les phénomènes de cicatrisation associés. Donc pour limiter l'activation du système immunitaire, les molécules du sialome modulant les effecteurs du système immunitaire

(Francischetti *et al.*, 2009), pourraient probablement aussi agir sur le contrôle de la dégradation tissulaire alentour.

4. Les SGE favorisent la disparition des LC dans l'épiderme

L'analyse des populations cellulaires comme de la quantité de virus retrouvée indiquent que l'effet des SGE au point d'inoculation s'étend jusqu'au premier ganglion drainant (PLI). Une réduction du nombre moyen des LC sur le lieu de l'inoculation ou de gorgement de la tique a été observée pour chacun des porcs euthanasiés à 1h pi. Cette réduction est fortement amplifiée à 48h pi dans les biopsies des porcs ayant reçus des molécules de salive de tique, tendance également observée sur des LC de peau de cochon d'inde lors de la primo-infection par les tiques dures *Dermacentor andersoni* (Nithiuthai & Allen, 1984). Le rôle des LC est de transporter les antigènes étrangers du site d'infection aux ganglions drainants, avant d'être remplacées (Merad *et al.*, 2008). Le temps de remplacement dans l'épiderme n'est pas établi mais peut être relativement court puisque le recrutement de ces cellules a déjà été observé durant un gorgement de tiques dures. Toutefois, ces études s'intéressent à l'acquisition et l'expression de la résistance provoquée par les LC d'un hôte déjà sensibilisé après un premier contact tique-hôte (Francischetti *et al.*, 2009). Cet effet de turnover naturel semble amplifié à 48h pi lorsque le virus est inoculé seul. Notre modèle montre qu'il y a un nombre de LC plus important au niveau du transect épidermique au-dessus de l'inoculation probablement lié à un effet du virus. Plusieurs études indiquent que le virus de la PPA induit une surproduction de cytokines TNF- α par des cellules infectées, ce qui augmente le recrutement des cellules cibles préférentielles du virus sur le lieu d'inoculation (Gomez-Villamandos *et al.*, 2013, Gomez del Moral *et al.*, 1999). Or, les LC sont susceptibles au virus de la PPA (Gregg *et al.*, 1995a, Gregg *et al.*, 1995b) et leur migration peut dépendre de la production de TNF- α induit par les macrophages et neutrophiles. A contrario, dans les groupes TICK ou avec SGE, le pouvoir immunomodulateur de la salive à 48h pi se manifeste par une nette réduction du nombre de LC. Les DCs immatures exposées à de la salive de tique pourrait effectivement subir une baisse de migration et induire un mauvais renouvellement des LC (Oliveira *et al.*, 2008). De plus, les LC sont des sentinelles ayant un rayon d'action limité à partir de l'épiderme, qui sont rapidement substituées par des cellules dendritiques et des macrophages lors de lésions plus profondes du derme. Nos résultats montrent que les biopsies des groupes avec inoculation de SGE présentent un net déficit de cellules de Langerhans vis-à-vis des biopsies des groupes avec virus seul. Cette diminution observée dans les groupes ID ASFV + SGE est plus faible que celle du groupe TICK mais reste statistiquement similaire, ce qui signifie que l'extrait de glandes

salivaires a un impact inhibiteur sur la densité des LC alors qu'il a été inoculé plus profondément que ne l'est la salive lors du gorgement naturel des tiques.

5. Les SGE favorisent le recrutement des macrophages dans le derme

Une fois l'épiderme et la barrière de LC franchis, les pathogènes font face à une seconde ligne de défense constituée principalement par une arrivée massive des cellules immunitaires (par exemple les neutrophiles, les granulocytes puis les macrophages) (Francischetti *et al.*, 2009, Shaw & Martin, 2009, Theis & Budwiser, 1974) comme décrit pour *Ornithodoros parkeri*, une tique molle, lors d'un gorgement sur un cochon d'inde sensible (Johnston & Brown, 1985). Toutefois, le type cellulaire intervenant précocement lors de la réponse hôte-tique dépend aussi du temps post gorgement et du niveau de sensibilité de l'hôte. Ainsi, chez *O. parkeri*, Johnston (Johnston & Brown, 1985) montrent qu'à 90 min sur hôte naïf, ce sont les mastocytes qui prédominent, alors que chez un hôte challengé, ce sont les éosinophiles et qu'à partir de 24h, on retrouve plutôt des mastocytes et neutrophiles chez les hôtes naïfs et des basophiles chez les challengés (Johnston & Brown, 1985, McLaren *et al.* 1983). Quant aux macrophages, leur activité serait inhibée chez les hôtes sensibles : prolifération, phagocytose ou production de cytokines (Wikel, 2013, Brossard & Wikel, 2004, Fontaine *et al.*, 2011), lors de gorgements longs par des tiques dures de façon similaire en présence de SGE ou de salive. Pourtant Francischetti *et al.* (Francischetti *et al.*, 2009) indiquent que globalement lors de primo-infections par les tiques, des macrophages sont présents dans la cavité de gorgement et les tissus lésés alentour. Seule une étude sur la stratégie d'évasion de *Dermacentor variabilis* montre un important recrutement de macrophages (Kramer *et al.*, 2011). Notre étude décrit un modèle légèrement différent puisque le gorgement des tiques *O. porcinus* dure 60 minutes environ, contrairement au long gorgement des tiques dures (plusieurs jours). Nos résultats montrent un léger recrutement des macrophages à 1h pi quels que soient les groupes de porcs étudiés. Ce recrutement est probablement la conséquence directe des lésions provoquées par l'inoculation ou le gorgement de tique (Shaw & Martin, 2009). Néanmoins, il s'intensifie nettement à 48h pi. En regardant plus attentivement, il s'avère que les porcs des groupes de l'essai LD présentent un recrutement accru de macrophages comparé aux porcs ayant reçus des molécules de salive sans virus (ID SGE et TICK). Les macrophages semblent donc plus sensibles à l'immunomodulation provoquée par l'effet du virus et la surexpression de cytokines TNF- α qui accompagne l'infection des cellules, que par celui des molécules de salive de tique. Les résultats de l'essai HD montrent aussi un effet prépondérant du virus lorsqu'on les met en relation avec l'effet d'inhibition ou d'apoptose de la dose virale inoculée discuté

plus haut. Cependant, même s'il est moins prononcé que celui du virus, l'effet immunomodulateur de la salive de tique est observable dans chacun des essais (LD, HD, no ASFV), en provoquant un recrutement macrophagique. Le stress subi par ces macrophages est probablement différent de celui provoqué par l'effet du virus. Une différence de maturation ou de susceptibilité à l'infection pourrait en partie expliquer la présence d'une densité macrophagique plus importante dans le groupe ID ASFV + SGE vis-à-vis du groupe ID ASFV de l'essai HD.

En outre, si cela a déjà été observé sur d'autres organes ainsi que lors d'essais *in vitro* lors d'infection par le virus de la PPA (Sanchez-Torres *et al.*, 2003, Salguero *et al.*, 2002), notre étude montre pour la première fois, *in vivo*, dans la peau de porc, que les zones de très fort recrutement de cellules panmyéloïdes (Figure 58A) correspondent aux zones où les cellules sont le plus infectées par le virus de la PPA (Figure 58B).

6. Les SGE retardent l'infection virale dans le premier ganglion drainant

Une fois le virus entré dans l'organisme de l'hôte, il se disperse de manière précoce grâce aux cellules présentatrices d'antigènes infectées qui transitent via la lymphe ou le sang vers les organes cibles. Une certaine proportion des cellules mononucléées phagocytaires après infection et maturation agissent comme APC dans les organes lymphoïdes. Cette stratégie de dissémination rapide se retrouve à la fois chez d'autres virus à l'origine de fièvres hémorragiques et d'autres arbovirus (Kramer *et al.*, 2011, Jamin *et al.*, 2006, Briant *et al.*, 2014). Nos résultats de détection virale, quelle que soit la dose inoculée, indiquent une dissémination précoce dès 48h pi, du virus de la PPA vers la rate telle que décrite dans de précédentes études (Gomez-Villamandos *et al.*, 2013), et vers les autres organes lymphoïdes (amygdales et PLO). Ces résultats sont similaires entre les groupes ayant reçus ou non des SGE excepté lorsque l'on examine localement la dissémination du virus. Elle est en effet moins importante dans les PLI, des porcs dont l'inoculum contient des SGE. Nous avons vérifié lors d'une étude comparative préliminaire que la présence de SGE n'avait aucune influence sur la détection ou la multiplication du virus sur macrophages alvéolaires de porc (données non montrées), excluant ainsi un éventuel effet antagoniste des SGE sur les méthodes de détection.

Ces données montrent que l'effet des SGE *in vivo* reste précoce, puisque non observable à la fin de l'expérience, et localisé au site d'inoculation. Ces résultats indiquent aussi que les molécules de salive agiraient plutôt sur la modulation des CPA que sur le virus. Trois hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer ce phénomène local. La première repose

sur un principe de dilution, la part des CPA portant des antigènes de virus serait diminuée au profit de ceux portant des antigènes SGE. Marquet *et al.* (Marquet *et al.*, 2011) estiment que le nombre de LC migrants vers les ganglions via la lymphe représente environ 11% des DCs afférents. Or on sait que les CPA et particulièrement les LC sont capables de présenter des antigènes de SGE de tiques dures aux lymphocytes T dans les ganglions *in vitro* et *in vivo* (Allen *et al.*, 1979, Nithiuthai & Allen, 1984, Nithiuthai & Allen, 1985). La deuxième hypothèse plus probable serait que les SGE agissent sur les CPA par des phénomènes d'immuno-régulation. Les molécules de salive pourraient induire une apoptose des CPA ou une inhibition de leur migration vers les PLI, rendant la réplication virale moins efficace dans ces derniers. Toutefois, la détection du nombre de CPA dans les ganglions, par immunofluorescence avec utilisation d'anticorps anti-S-100 (Gregg *et al.*, 1995a) et d'anticorps anti-SWC3/CD172 ne montre pas de différence de densité de CPA entre les groupes de porcs avec ou sans SGE (Figure 42). La troisième hypothèse repose sur certaines études *in vitro* et *in vivo* montrant que la salive de tique dure est capable de sous réguler les fonctions des CPA (Mason *et al.*, 2014, Skallova *et al.*, 2008, Oliveira *et al.*, 2008). Ainsi, les SGE d'*O. porcinus* pourraient influencer l'efficacité des CPA à présenter les antigènes viraux aux lymphocytes T dans les ganglions drainants.

C. Scénarios d'infection et perspectives

Les modulations immunitaires observées restent cependant fonction des combinaisons arthropode-pathogène-hôte entrant en jeu, voire même des modalités d'études (Xu *et al.*, 2007). Barratt-Due *et al.* (Barratt-Due *et al.*, 2013) montrent que la molécule OmCl, présente dans la salive d'*O. moubata*, est capable de moduler l'hémostase du porc *in vivo*, d'atténuer la production de TNF- α et IL-6 et de réduire la migration des neutrophiles alors que son étude précédente avait montré que le TNF- α n'est pas modulé par cette protéine *in vitro* dans des cellules le porc (Barratt-Due *et al.*, 2011). Même si des patrons communs semblent se dégager, il est délicat de modéliser des relations et ainsi d'extrapoler les réactions à d'autres modèles. Par exemple, la majorité des vecteurs modulent le système immunitaire de l'hôte au profit de la prolifération du pathogène. Cependant, des études contraires existent aussi comme celle d'Ader *et al.* sur la salive d'*Aedes aegypti* inhibant *in vitro* l'infection par le virus de la dengue chez les DCs humaines (Ader *et al.*, 2004). Le scénario d'infection du virus de la PPA chez le porc suite à une morsure de tique *O. porcinus* que nous pouvons élaborer à partir de nos résultats reste limité mais ouvre de nombreuses pistes de recherches :

Lors du gorgement, les molécules de salive vont inhiber le renouvellement des cellules de Langerhans dans l'épiderme, et activer un recrutement macrophagique. Ces résultats sont à

rapprocher de ceux décrits par (Kramer *et al.*, 2011), où ils montrent que *Dermacentor variabilis* induit dans un modèle souris un recrutement macrophagique qui va inhiber l'inflammation grâce à la production de cytokine IL-10. On peut alors supposer que le recrutement de macrophages que nous observons soit du même ordre. De surcroît, dans le cas de l'infection par le virus de la PPA, les macrophages sont aussi des cellules cibles préférentielles du virus. Ce recrutement pourrait alors permettre d'amplifier l'infection au plan local comme cela semble être le cas avec les résultats de détection virale dans la peau lors d'une inoculation de forte dose virale, sans être pour autant significatif. Cependant, ces résultats doivent être approfondis et confirmés puisqu'ils ont été obtenus seulement à partir de groupes inoculés en forte dose. Or ce qui a fait la robustesse de tous les résultats majeurs de ce chapitre est qu'ils soient observables de façon similaire à la fois en forte dose et en faible dose.

Par la suite, les molécules de salive semblent agir sur les CPA en inhibant leurs actions, voire leur migration vers les premiers ganglions lymphatiques drainants. Cette idée est supportée par l'observation d'une forte diminution à 48 hpi des cellules infectées par le virus de la PPA dans le ganglion parotidien suite à la co-inoculation de virus et de SGE alors que ce phénomène n'est pas observé lors de l'inoculation de virus seul. Cependant, l'action de la salive sur les CPA reste encore floue. Les quelques résultats de marquages réalisés sur les cellules dendritiques interdigitalisées dans ces ganglions laissent penser que les molécules de salive de tique pourraient avoir plutôt une action inhibitrice sur l'action des CPA à présenter des antigènes viraux aux cellules immunitaires du ganglion que sur leur migration. Cependant, les 2 hypothèses restent valables et l'étude très récente de (Vachier *et al.*, 2015) montre qu'elles ne s'excluent pas l'une l'autre. En effet, l'étude réalisée sur la tique dure *A. variegatum* suggère que sa salive est capable d'inhiber la migration des macrophages et des CPA vers les ganglions lymphatiques drainants chez la souris *in vivo* et en parallèle d'empêcher la maturation *in situ* des macrophages dérivés de monocytes en tant que CPA. Leur protocole permet d'évaluer la migration des CPA provenant des sites de lésion grâce à un marquage de fluorescence générale sur le site de la lésion. Ce protocole, même s'il est réalisé à 4 jours dans leur étude, pourrait probablement être transposable à notre modèle et permettre de donner une réponse partielle à notre hypothèse.

L'observation d'une modulation très locale, dans la peau et dans les premiers ganglions drainants, montre bien que les molécules de salive ont un pouvoir immunomodulateur conséquent sur le système immunitaire précoce. Ainsi, dans le cas de l'infection par le virus de la PPA, lorsque l'effet de la salive se dissipe, l'infection par le virus est déjà bien installée localement au point de morsure.

Pour compléter ce scénario et comprendre un peu mieux l'effet de la salive lors de l'infection, il serait intéressant de tester en priorité l'effet que provoque une morsure de tique infectée par le virus de la PPA sur la modulation des cellules immunitaires. Ensuite, comme nous l'avons vu, la cinétique de prélèvements sanguins de notre étude n'a pas permis d'évaluer la cinétique de dispersion du virus sur les premières heures post infection. À 48 hpi, le virus a déjà disséminé dans tout l'organisme du porc par voie systémique. De plus l'utilisation de la souche Ambaton/02 très virulente n'a pas permis, même à faible dose, d'évaluer l'effet immunomodulateur des SGE sur la dissémination précoce du virus. Une étude plus approfondie, par des prises de sang très régulières dans les premières 72 hpi combinées à l'utilisation d'une souche de PPA moins virulente, pourrait fournir des éléments de réponse sur le pouvoir de la tique à améliorer ou non la transmission d'une souche de virus de la PPA chez le porc. Elle pourrait aussi permettre de relier les modulations locales observées avec la réponse systémique. Il serait notamment intéressant de vérifier l'expression et la dispersion de certaines cytokines comme le TNF- α et l'IL-10 par les macrophages de la peau en présence ou en absence de molécules de salive de tiques *Ornithodoros* lors de l'inoculation intradermique de virus de la PPA. L'étude des cellules dendritiques, principales CPA, serait également très intéressante pour évaluer quel type d'inhibition se produit (activation, recrutement, présentation d'antigène) entre la peau et les ganglions. Enfin, comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, la compétence vectorielle est une notion de couple espèce de tique-souche virale, il serait donc aussi très intéressant d'évaluer et de comparer le pouvoir immunomodulateur de la salive d'une tique comme *O. erraticus* qui provoquent des lésions tissulaires plus importante qu'*O. porcinus* lors de son gorgement. Une telle étude comparative pourrait permettre de mieux caractériser les phénomènes d'immunomodulation au sein d'un même genre de tiques, par exemple *Ornithodoros*, en lien avec leur compétence vectorielle.

Conclusion générale

L'étude d'un modèle tripartite parasite-vecteur – hôte est complexe. Chaque intervenant doit s'adapter aux défenses des autres pour conserver une bonne valeur sélective. Les changements environnementaux rapides liés à l'activité humaine ne permettent plus aux organismes, dans un certain nombre de cas, de maintenir l'équilibre qu'ils ont créé dans leur milieu naturel pour conserver chacun cette valeur sélective. L'émergence de parasites en dehors de leur cycle épidémiologique traditionnel devient alors très rapidement néfaste pour l'activité humaine, que ce soit sur un plan sanitaire, économique ou social.

Pour mieux appréhender et faire face à ces émergences, des sciences multidisciplinaires se sont progressivement mises en place au cours de ces 20 dernières années. Ce projet de thèse en est un exemple, puisqu'il fait intervenir à la fois les sciences vétérinaires et les sciences écologiques pour étudier l'interaction tique ornithodore – virus de la PPA – porc domestique. Alors que la PPA était jusqu'alors considérée comme une fièvre hémorragique des porcs domestiques circulant essentiellement en Afrique, sa diffusion en Europe de l'Est depuis son introduction en 2007 en Géorgie pose la question du rôle potentiel des tiques *Ornithodoros* européennes et/ou caucasiennes dans le cycle de maintien et de transmission du virus. L'étude de la compétence vectorielle des tiques *Ornithodoros* pour le virus de la PPA, dans sa globalité mais aussi relativement aux acteurs spécifiquement rencontrés en Europe, semblait ainsi nécessaire.

Les résultats obtenus durant ce projet de thèse ont permis :

i) de décrire les patrons généraux qui caractérisent la compétence vectorielle des tiques *Ornithodoros* pour le virus de la PPA, et de critiquer les différentes méthodologies utilisées pour tester et mesurer cette compétence afin de proposer un protocole standard et optimisé permettant de limiter les biais méthodologiques. Il résulte de ce chapitre que les tiques *Ornithodoros*, malgré le manque important de données sur ce modèle, sont de bons vecteurs du virus de la PPA mais que leur compétence vectorielle dépend en grande partie du couple tique-virus étudié et des conditions dans lesquelles elles sont étudiées en laboratoire.

ii) de mieux estimer le faible risque que représenterait l'introduction de souches virales de génotype II, comme la souche caucasienne circulant actuellement en Europe de l'est, dans la zone méridionale européenne où l'espèce de tique *O. erraticus* est présente. En effet, même

si les tiques peuvent s'infecter avec notamment la souche Georgia/2007/1, elle semble dans nos conditions expérimentales incapables de transmettre le virus lors d'un repas de sang.

iii) d'évaluer l'impact de deux facteurs intrinsèques sur la compétence vectorielle des tiques *Ornithodoros* pour le virus de la PPA : d'une part, l'importante implication des adaptations tique – virus sur l'infection des tiques et la transmission du virus au porc domestique, et d'autre part l'immunomodulation de la salive de tique *O. porcinus* sur les réponses immunes précoces du porc domestique, qui modifient favorablement le site de gorgement pour l'infection du virus, mais aussi à travers une action plus généralisée lors de l'infection du porc par le virus de la PPA.

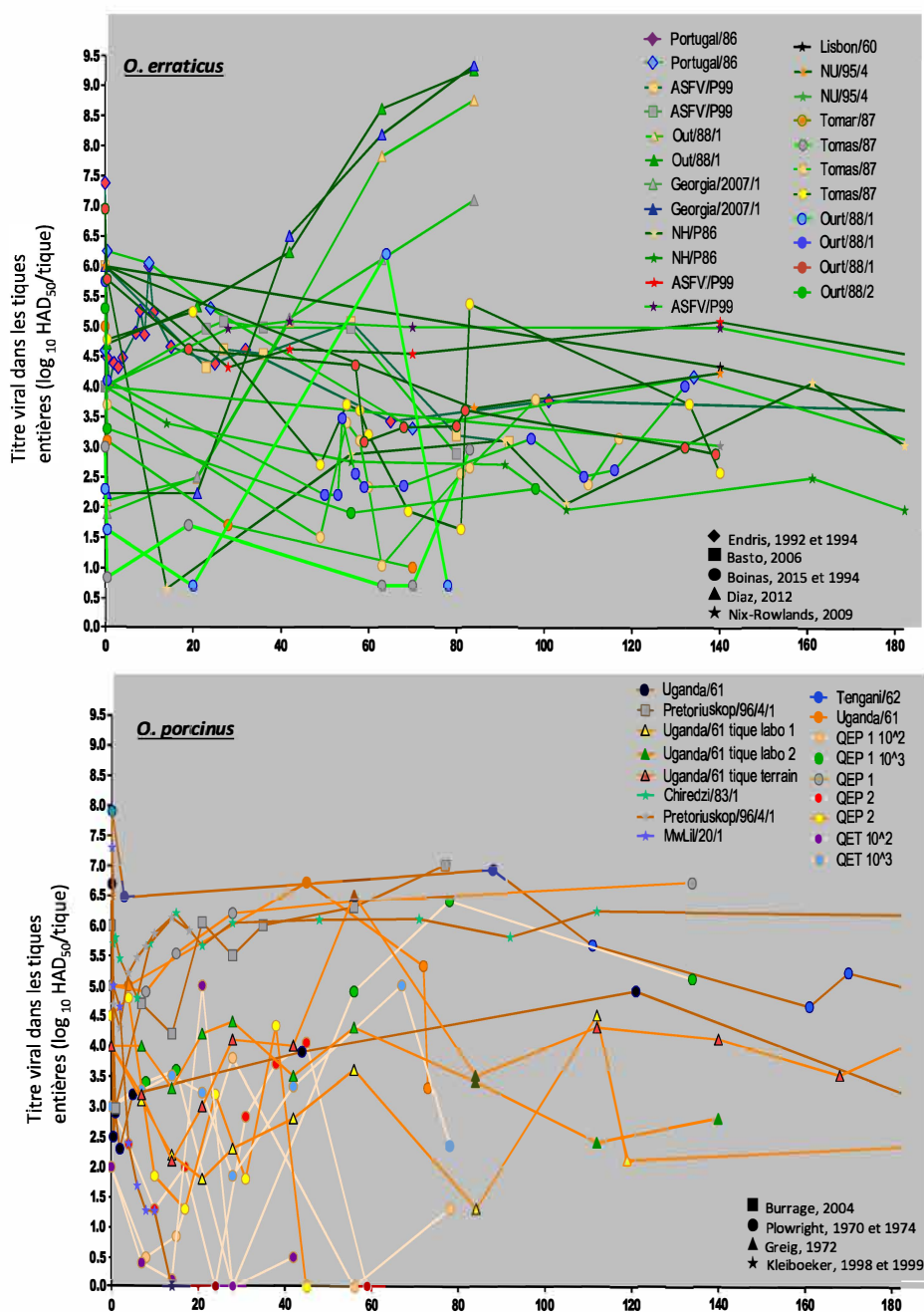
Si les tiques *Ornithodoros* ont été à travers notre étude de la compétence vectorielle le fil conducteur de l'histoire, nous avons pu voir aussi que l'origine et la nature même du virus de la PPA jouent un rôle essentiel dans les résultats de compétence vectorielle. L'environnement du couple tique-virus n'a pas été à proprement parler traité dans cette thèse. Toutefois, de nombreux résultats sur d'autres modèles vecteur-parasite suggèrent par exemple l'importance de la température extérieure ou du microbiome du vecteur dans le succès de son infection. L'hôte vertébré, dans une certaine mesure, pourrait aussi être considéré comme un élément direct de cet environnement, et avoir un effet sur la compétence vectorielle. Ainsi, puisque l'expression clinique suite à l'infection virale dépend de l'hôte (par exemple les symptômes et la mortalité chez les porcs domestiques, l'absence de signes cliniques et de lésions chez les phacochères), il est possible que le génome viral évolue en fonction de son hôte ou que l'expression de ses gènes, suite au bourgeonnement à travers une cellule de porc ou de phacochère, ne soit pas identique et permette d'influencer l'infection des tiques par une plus ou moins grande aptitude du virus à passer les barrières d'hôte. Cette hypothèse est suggérée par certaines études sur la délétion-modification de certains gènes viraux qui peuvent jouer sur le succès d'infection et de multiplication virale dans de la tique. De plus, comme de nombreuses études l'ont déjà montré même s'il existe des tendances communes et répétables, les résultats d'interaction dépendent bien des combinaisons d'organismes étudiés. En ce qui concerne la comparaison entre le porc domestique et les phacochères, une seule étude aborde indirectement le sujet en comparant l'infection des tiques par la souche de virus Transvaal sur des porcs et des phacochères virémiques (Thomson, 1985) ; aucune tique n'est au final infectée sur phacochère alors qu'un tiers des tiques sont infectées sur porc. Les auteurs suggèrent un effet dose puisque les titres viraux dans le sang de porcs étaient dix fois plus élevés que chez le phacochère mais aucun n'envisage un changement de conformation du virus selon l'hôte. Par ailleurs, aucune étude n'a évalué expérimentalement

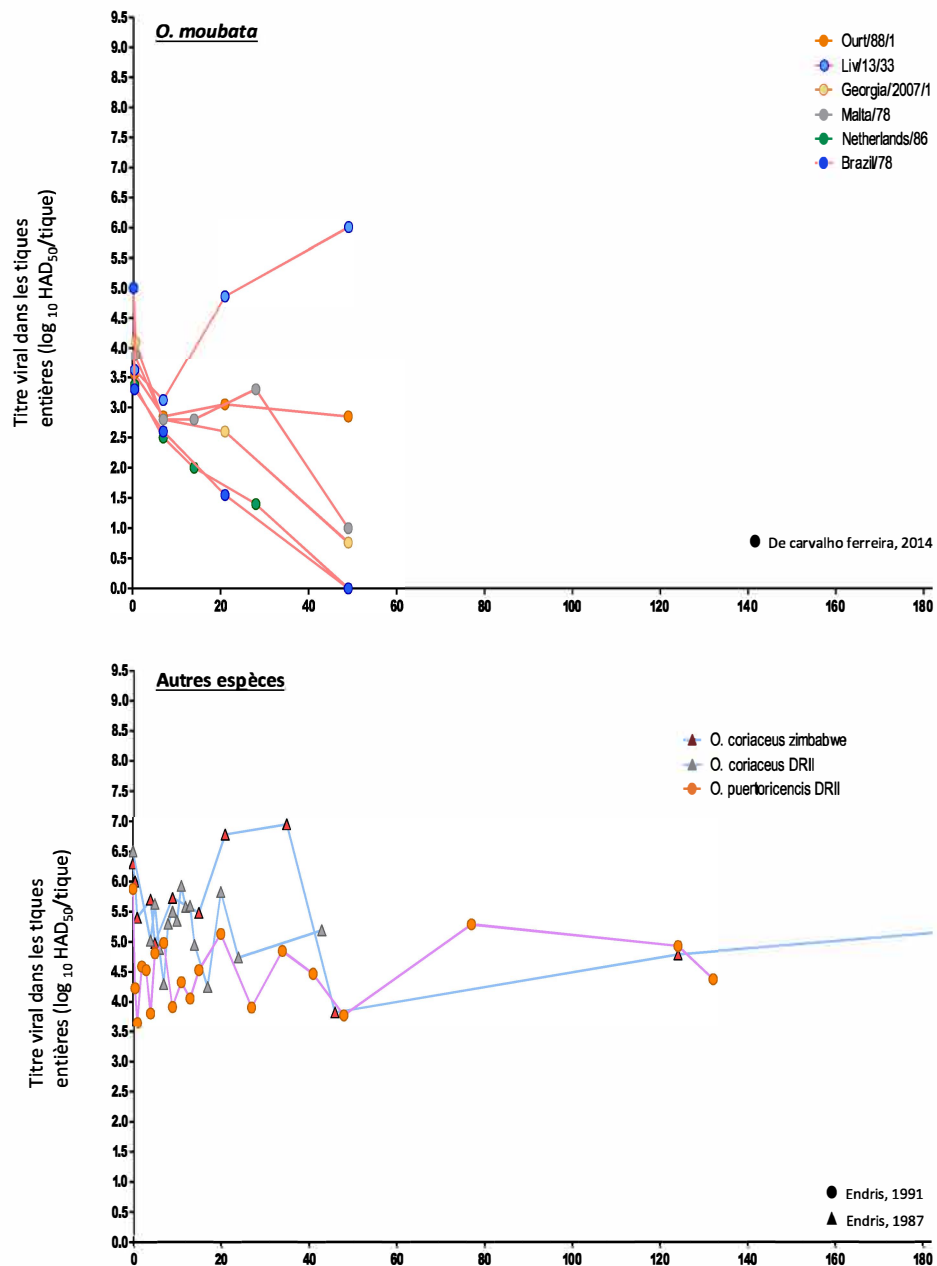
la transmission du virus par les tiques aux phacochères et seules les études épidémiologiques nous indiquent que le virus circule entre les populations de phacochères et de tiques. Toutefois, aux vues de nos résultats sur l'immunomodulation par la salive de tique chez le porc, on est en mesure de se demander si une telle réaction serait aussi observée chez les phacochères dont la réponse immunitaire s'avère déjà être différente face à l'infection du virus seul.

Cependant, prendre en compte le rôle de l'hôte vertébré dans la compétence vectorielle ouvre aussi sur la notion de capacité vectorielle permettant de comprendre d'autres aspects de ce modèle tripartite tique ornithodore – virus de la PPA – suidé.

Annexes

Annexe 1 : Graphiques des données de cinétiques sur 182 jours post gorgement infectieux de différentes souches de virus dans différentes espèces de tique rapportées dans les publications traitant de compétence vectorielle.





Le titre moyen par tique infectée est reporté à différents temps entre 0 et 182 dpi en abscisse, et différentes doses virales dans le sang de gorgement par couleur. Les couleurs des courbes des graphiques *O. erraticus* et *O. porcinus* correspondent à la dose de virus dans le sang de gorgement, foncés $\geq 10^6$ HAD₅₀/ml., intermédiaires entre $\geq 10^4$ HAD₅₀/ml. < 10^6 HAD₅₀/ml. et claires < 10^4 HAD₅₀/ml. La dose de virus dans le sang de gorgement des autres espèces de tiques présentes sur ce graphique était $\geq 10^6$ HAD₅₀/ml.

Annexe 2 : Récapitulatif des données méthodologiques des études sur la compétence vectorielle

Espèce de tique	<i>O. moubata</i>												
Souche virale	Transvaal CV	Liv/13/33				Vic/T90/1			Brazil/78	Netherlands/86	Malta/78	Ourt/88/1	Georgia/2007/1
N°des articles de références	26	1	10	11	14	10	11	14	1	1	1	1	1
Titre viral dans les tiques	+	+	+	ND	+	+	ND	+	+	+	+	+	+
Taux d'infection	+	+	+	ND	+	+	ND	+	+	+	+	+	+
type de résultats (moyenne, écart-type, gamme, individuel)	Moyenne	Moyenne +/-	Gamme	ND	Moyenne +/-	Gamme	ND	Moyenne +/-	Moyenne +/-	Moyenne +/-	Moyenne +/-	Moyenne +/-	Moyenne +/-
Suivi de cinétique	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	+	+	+
Titre à 0 Jpi ou la 1 ^{re} semaine	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	+	+	+
pesée des tiques pour estimation du titre de virus ingéré	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TH au porc	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Taux d'infection ou titre du virus dans les tiques après la TH	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Plusieurs essais de TH, utilisation des mêmes tiques	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Repas de sang sur membrane artificielle additionnelle	ND	Ne donne pas de résultats	Ne donne pas de résultats	Ne donne pas de résultats	+	Ne donne pas de résultats	Ne donne pas de résultats	+	Ne donne pas de résultats	Ne donne pas de résultats	Ne donne pas de résultats	Ne donne pas de résultats	Ne donne pas de résultats
Détection du virus dans les sécrétions (salive, fluide coxal)	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND
Détection du virus dans les organes sécréteurs (GS et GC)	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Détection du virus dans l'hémolymph	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Détection du virus dans l'intestin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Essai de TS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Détection du virus dans les organes sexuels	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
durée de l'essai de TS	ND	ND	ND	ND	11 semaines	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Essai de TOT	ND	ND	+	ND	+	+	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND
Sur combien de cycles ?	ND	ND	3	ND	3	3	ND	3	ND	ND	ND	ND	ND
Détection du virus dans les œufs, larves ou nymphes	ND	ND	+ Œufs (vérification histologique)	ND	+ Œufs (vérification histologique), Ny1	+ Œufs (vérification histologique)	ND	+ Œufs (vérification histologique), Ny1	ND	ND	ND	ND	ND
Essai de TST	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND
Évocation de la mortalité	ND	ND	+	+	+	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND
Durée de l'étude (Jpi)	< 60	< 60	> 61 à < 181	> 61 à < 181	> 61 à < 181	> 61 à < 181	> 61 à < 181	> 61 à < 181	< 60	< 60	< 60	< 60	< 60

Espèce de tique	O. porcinus																					
Souche virale	Chiredzi/83/1		Zimbabwe/83/a	Madagascar/08	tengani/62		MwLil/20/1		KWH/12			QET	QEW	Crocodil/96/1	Nooitverwacht/96/6	Uganda/61				Pretoriuskop/96/4/1		
N°des articles de références	12	13	22	4	31	32	12	21	28	29	30	31	31	13	13	28	29	31	32	9	12	13
Titre viral dans les tiques	ND	+	ND, titre les mortes	ND	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Taux d'infection	+	+	ND	+	+	ND	+	+	+	+	ND	+	+	+	+	+	+	ND	+	+	+	+
Type de résultats (moyenne, écart-type, gamme, individuel)	Individuel	Moyenne +/-	ND	ND	Moyenne Individuel	Moyenne +/- Gamme	Moyenne +/-	Gamme Individuel	Moyenne Gamme	Moyenne	Moyenne, Individuel	Individuel	Individuel	Moyenne +/-	Moyenne +/-	Moyenne Gamme	Moyenne	Moyenne Individuel	Moyenne +/- Gamme	Moyenne +/-	Moyenne +/-	Moyenne +/-
Suivi de cinétique	+	+	ND	ND	+	ND	+	ND	+	+	ND	+	+	+	+	ND	+	+	ND	+	+	+
Titre à 0 Jpi ou la 1 ^{re} semaine	1er	+	ND	ND	1er	ND	+	ND	1er	1er	ND	1er	1er	ND	ND	1er	1er	+	ND	+	+	ND
Pesée des tiques pour estimation du titre de virus ingéré	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	capillaire	ND	+	ND	ND
TH au porc	ND	+	+	ND	+	+	ND	ND	+	ND	+	+	+	+	+	+	ND	+	+	ND	ND	+
Taux d'infection ou titre du virus dans les tiques après la TH	ND	Titre (proche)	Taux	ND	Titre (proche)	non	ND	ND	non	ND	Taux	non	non	Titre (proche)	Titre (proche)	non	ND		ND	ND	ND	Titre (proche)
Plusieurs essais de TH, utilisation des mêmes tiques	ND	6, oui	3, ?	ND	Jusqu'à 7, oui	non	ND	ND	non	ND	Jusqu'à 4, oui	non	non	non	non	non	ND	Jusqu'à 4, oui	non	ND	ND	non
Repas de sang sur membrane artificielle additionnelle	ND	+	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	capillaire	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	ND
Détection du virus dans les sécrétions (salive, fluide coxal)	ND	+	ND	ND	ND	+	167	ND	+	ND	+	+	+	ND	ND	+	ND	+	+	+	+	ND
Détection du virus dans les organes sécréteurs (GS et GC)	ND	+	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	+	ND	ND	ND	+	+	+	+	ND	ND	+	+	+
Détection du virus dans l'hémolymph	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	ND	ND	+	+	ND
Détection du virus dans l'intestin	ND	+	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	+	ND	ND	ND	+	+	+	+	ND	ND	+	+	+
Essai de TS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Détection du virus dans les organes sexuels	ND	+	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	+	ND	ND	ND	+	+	+	+	ND	ND	+	+	+
durée de l'essai de TS	ND	91	ND	ND	ND	ND	400 Jpi	ND	3 CG	10 semaines	ND	ND	ND	91 Jpi	91 Jpi	73	50 semaines	ND	ND	148 Jpi	400 Jpi	91 Jpi
Essai de TOT	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND	+	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sur combien de cycles ?	ND	ND	4	ND	ND	ND	ND	ND	plus d'1	ND	4	ND	ND	ND	ND	plus d'1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Détection du virus dans les œufs, larves ou nymphes	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+ Œufs	ND	+ Œufs, + Ny1	ND	ND	ND	ND	+ Œufs	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Essai de TST	ND	ND	+	ND	ND	+	ND	terrain ne sait pas	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	semble pas	ND	ND
Évocation de la mortalité	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND
Durée de l'étude (Jpi)	< 60	> 182	> 182	> 182	> 61 à < 181	> 61 à < 181	> 182	> 182	> 182	> 182	> 61 à < 181	> 61 à < 181	< 60	> 61 à < 181	> 61 à < 181	> 61 à < 181	> 61 à < 181	> 182	> 61 à < 181	> 61 à < 181	> 61 à < 181	> 182

Espèce de tique	O. erraticus																			
Souche virale	Zimbabwe/ 83/a	Portugal/ 86			Tomar/87	Ourt/88/1			Ourt/88/2	Ourt		Mart		ASFV/P99		Lisbon 60	NH/P68		Nu 95/4	Georgia/2007/1
N° des articles de références	22	16	19	18	15	2	3	15	15	3	15	3	15	7	8	8	5	8	8	2
Titre viral dans les tiques	ND	+	ND	+	+	+	ND	+	+	ND	+	ND	+	+	+	+	+	+	+	+
Taux d'infection	ND	+	ND	+	+	+	ND	+	+	ND	+	ND	+	+	+	+	+	+	+	+
Type de résultats (moyenne, écart-type, gamme, individuelle)	ND	Moyenne +/- Gamme	ND	Moyenne +/-	Moyenne +/-	Individuel	ND	Moyenne +/-	Moyenne +/-	ND	Moyenne	ND	Moyenne	Moyenne +/-	Moyenne +/-	Moyenne +/-	Moyenne +/-	Moyenne +/-	Moyenne +/-	Individuel
Suivi de cinétique	ND	ND	ND	+	+	+	ND	+	+	ND	ND	ND	ND	+	+	ND	+	+	ND	+
Titre à 0 Jpi ou la 1 ^{re} semaine	ND	+	ND	+	+	+	ND	+	+	ND	+	ND	ND	1er	+	+	+	+	+	+
Pesée des tiques pour estimation du titre de virus ingéré	ND	+	ND	ND	+	ND	ND	+	+	ND	+	ND	ND	+	+	+	+	+	+	ND
TH au porc	+	(ne donne pas les résultats)	+ Adulte - Larves	ND	+	+	ND	+	-	-	+	+	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Taux d'infection ou titre du virus dans les tiques après la TH	ND	Titre (+), Taux	ND	Titre (+), Taux	Titre (+)	ND	ND	Titre (+)	Titre (+)	ND	Titre (+), Taux	ND	Titre (+), Taux	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Plusieurs essais de TH, utilisation des mêmes tiques	4, ?	non	ND	12, non	au moins 3, non	ND	4, ?	au moins 4, non	au moins 2, ?	7, ?	au moins 7, non	2, ?	au moins 2, non	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Repas de sang sur membrane artificielle additionnelle	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Détection du virus dans les sécrétions (salive, fluide coxal)	ND	ND	ND	ND	+ coxal	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	- coxal lors repas infectieux	ND	ND
Détection du virus dans les organes sécréteurs (GS et GC)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Détection du virus dans l'hémolymph	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Détection du virus dans l'intestin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Essai de TS	ND	+	ND	ND	+ 1 fois	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Détection du virus dans les organes sexuels	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
durée de l'essai de TS	ND	5 CG	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Essai de TOT	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sur combien de cycles ?	4	5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Détection du virus dans les œufs, larves ou nymphes	0	+ Lv	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Essai de TST	+	+	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	use pls mais semble pas faire TST	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Évocation de la mortalité	+	+	+	+	+	ND	ND	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Durée de l'étude (Jpi)	> 182	> 182	> 182	> 182	> 61 à < 181	> 61 à < 181	> 182	> 61 à < 181	> 61 à < 181	> 182	> 61 à < 181	> 182	> 61 à < 181	> 182	> 182	> 182	> 182	> 182	> 61 à < 181	> 61 à < 181

Espèce de tique	<i>O. sonrai</i>	<i>O. coriaceus</i>							<i>O. savignyi</i>		<i>O. puertarcensis</i>			<i>O. parkei</i>	<i>O. turicata</i>
Souche virale	Senegal/06	Zimbabwe/83/b	Zimbabwe /82	DRII		Lisbon/60	Tengani/62	Uganda/61	Liv/13/33	Malta/78	DRII			Zimbabwe/82	unknow
N°des articles de références	6	23	24	23	24	27	24	27	25	25	17	20	24	24	24
Titre viral dans les tiques	ND	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	+	ND	+	ND
Taux d'infection	+	+	+	+	+	ND, pas d'info sur le nbr de tique +	+	ND, pas d'infos sur le nbr de tiques +	+	ND, pas d'infos sur le nbr de tiques +	ND	+	ND	ND	ND
type de résultats (moyenne, écart-type, gamme, individuelle)	ND	Moyenne +/-	Moyenne +/-	Moyenne +/-	Moyenne +/-	Moyenne	Moyenne +/-	Moyenne	Individuel	Gamme	ND	Moyenne +/-	ND	Moyenne	ND
Suivi de cinétique	ND	+	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND	+	ND
Titre à 0 Jpi ou la 1 ^{re} semaine	ND	+	+	+	+	ND	+	ND	ND	ND	ND	+	ND	1er	ND
pesée des tiques pour estimation du titre de virus ingéré	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TH au porc	ND	ND	+	ND	+	+	+	-	+	ND	ND	+	+	-	+, (- pour la vieille colonie)
Taux d'infection ou titre du virus dans les tiques après la TH	ND	ND	Taux	ND	Taux	non	TAUX	NON	TITRE (+)	TITRE (+), TAUX	ND	TITRE (+)	TAUX ND	TITRE (proche)	ND
Plusieurs essais de TH, utilisation des mêmes tiques	ND	ND	2, oui	ND	7, oui	jusque 3, ?	3, oui	jusque 4, ?	2, oui	2, oui une partie	ND	9, non	5, oui	au moins 2	
Repas de sang sur membrane artificielle additionnelle	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	+	ND	ND	ND	ND	ND
Détection du virus dans les sécrétions (salive, fluide coxal)	ND	ND	ND	ND	ND	- coxal	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Détection du virus dans les organes sécréteurs (GS et GC)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+
Détection du virus dans l'hémolymphe	ND	+	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	IF
Détection du virus dans l'intestin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	IF
Essai de TS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Détection du virus dans les organes sexuels	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
durée de l'essai de TS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Essai de TOT	ND	ND	ND	ND	-	-	ND	-	-	ND	ND	ND	+	ND	ND
Sur combien de cycles ?	ND	ND	ND	ND	1	1	ND	3	1	ND	ND	ND	?	ND	ND
Détection du virus dans les œufs, larves ou nymphes	ND	ND	ND	ND	ND	- Lv	ND	-Lv	ND	ND	ND	ND	+Lv	ND	ND
Essai de TST	ND	ND	Ny2-Ad	ND	Ny2-Ad	+	Ny2-Ad	+	+	+	ND	+	+	ND	ND
Évocation de la mortalité	ND	ND	0,36	ND	40 %	moribond	0,19	moribond	ND	ND	+	+	ND	ND	ND
Durée de l'étude (Jpi)	> 182	> 61 à < 181	> 182	< 60	> 182	> 61 à < 181	>182	>61 à <181	>61 à <181	>61 à <181	>182	>182	>182	>61 à <181	<60

TH : transmission horizontale ; TOT : transmission trans-ovarienne ; TST : transmission transtadiale ; TS : transmission sexuelle ; GS : Glande salivaire ; CG : cycle gonotrophique ; ND : Données non décrites ; + : résultat positif ; - : résultat négatif ; +/- : écart-type ; Jpi : jours post-infection

Annexe 3 : Rendu des avis favorables des saisines auprès du comité d'éthique n°12-091 et n°15-020



Madame Marie-Frédérique Le Potier
Anses site de Ploufragan
Les Croix
22440 PLOUFRAGAN

N° du Dossier : 12-091

N° de l'Avis : 20/12/12-15

Maisons-Alfort, le 20 décembre 2012

Objet : Avis du ComEth Anses/ENVA/UPEC

Madame,

Le ComEth Anses/ENVA/UPEC a procédé à l'examen de votre saisine concernant le projet intitulé « Etude de la compétence vectorielle de tiques Ornithodoros pour la transmission du virus de la peste porcine africaine », et vous informe que ce projet a reçu un **Avis favorable**.

Veuillez croire, Madame, en l'expression de mes salutations distinguées.

Bernard Andrieux
Vice-président du ComEth Anses/ENVA/UPEC

Anses-Direction Scientifique des Laboratoires
27-31 avenue du Général Leclerc 94701 Maisons-Alfort Cedex
Président : François Lachapelle
Secrétaire : Florence Lévissière
Tel : 01 49 77 20 31
Courriel : cometh@anses.fr

**Comité d'éthique
pour l'expérimentation animale**



anses
alimentation, environnement, travail



ENVA
École nationale vétérinaire d'Alfort



UNIVERSITÉ
PARIS-EST CRÉTEIL
VAL DE MARNE

Comité d'éthique Anses/ENVA/UPEC
Enregistré auprès du Comité National de Réflexion
Éthique sur l'Expérimentation Animale
Sous le numéro 16

Madame Marie-Frédérique Le Potier
Anses - Laboratoire de Ploufragan-Plouzané
Unité Virologie Immunologie Porcine
Zoopôle Les Croix
BP 53
22440 Ploufragan

N° du Dossier : 15-020

N° de l'Avis : 10/03/15-9

Maisons-Alfort, le 10 mars 2015

Objet : Avis du ComEth Anses/ENVA/UPEC

Madame,

Le ComEth Anses/ENVA/UPEC a procédé à l'examen de votre saisine concernant le projet intitulé « Evaluation de la capacité de tiques du genre *Ornithodoros erraticus* à transmettre au porc, la souche Georgia du virus de la Peste Porcine Africaine (15PPAD1) » et vous informe que votre projet a reçu un Avis favorable.

Veuillez noter que le présent avis du ComEth est informatif et ne vaut pas autorisation de projet, l'avis définitif sur votre projet vous sera rendu par le Ministère chargé de la recherche.

Veuillez croire, Madame, en l'expression de nos salutations distinguées.

Le secrétariat du ComEth Anses/ENVA/UPEC

Anses-Direction des Laboratoires
14 rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-Alfort Cedex
Président : François Lachapelle
Secrétaire : Florence Lavieyrie
Tél : 01 49 77 32 31
Courriel : cometh@anses.fr

Annexe 4 : Exemples de fiche de suivi clinique des animaux lors des essais expérimentaux

Fiche animalerie "Evaluation clinique de l'infection par le virus de la PPA"																			
Année : 2015		Semaine : 12		Bloc/animalerie : F1		Protocole : 15PPA01													
Date : 22.03.15		Heure : 07h40		Côté : 1		Evaluateur : YB													
Pression animalerie : 0		Douche						Visite											
		Nb/parc/15min			Aliment			Auges			Nb/parc/15min			Aliment			Auges		
		Tx	TQ	E	Dist.	Ref.	Prop.	Salé	Tx	TQ	E	Dist.	Ref.	Prop.	Salé				
		0	0	0	7.9	2.6	6	0	0	0	4	8.3	3.2	6	0				
Lot		MEM	MEM	MEM	MEM	MEM	MEM	MEM	MEM	MEM	MEM	MEM	MEM	MEM	MEM	MEM			
N° Porc		520	669	778	721	827	671	768	653										
Sexe Porc		M	M	F	M	M	F	M	M										
Température	Température	39.5	39.8	40.4	39.6	39.6	40.0	39.2	39.2										
	T° < 38,0°C (5)																		
	≥ 38,0°C T° < 38,5°C (1)																		
	> 38,5°C T° < 39,0°C (0)	0	0	2	0	0	2	0	0										
	≥ 40,0°C T° < 40,5°C (2)																		
Isapies	Paise nouriture réduite (1)																		
	Paise nouriture très réduite (2)																		
	Ne mange pas du tout (3)																		
Comportement animal couché	Apathique (1)																		
	Se lève après stimulation tactile (2)																		
	Se lève avec difficulté après stimulation tactile (4)																		
	Reste couché en dépit de stimulations tactiles (5)																		
Hémorragie cutanée	Erythème (Non = 0, Rouge = 1, Rouge = 2, Violet = 3, Violet foncé = 4)																		
	Gélatine (Non = 0, Léger = 1, 2mm = 2, 2 à 5 mm = 3, > 5mm = 4)																		
	Hémorragie (Non = 0, Petites taches lachées = 1, multiples petites taches = 2, multiples grandes taches = 3, Taches étendues = 4)																		
	Régions atteintes (aucune = 0, une = 1, 2 à 5 = 2, > 5 = 3, général = 4)																		
	Totaux	0																	
Gélatine articulaire	Arthralgies genouilles (1)																		
	Gélatine sévère avec difficultés locomotrices (4)																		
	Dyspnée et/ou toux (1)																		
	Dyspnée et/ou toux sévère (3)																		
	Jetage oculaire (yeux gonflés) (1)																		
Observations	Dartée (1)																		
	Dartée hémorragique (4)																		
	Hématurie (4)																		
	Vomissement (4)																		
	Total /40																		
Observations	Poids Tare deb																		
	Tare fin (inventaire 22/03/15)																		

Annexe 5 : Fiche d'autopsie des essais avec le virus de la PPA à compléter lors d'examens post-mortem.

Date		
Observateurs observer		
N°porc swine n°		
N°lot /Animalerie		
Aspect général General appearance		
Amygdales tonsil		
Thymus		
Ganglions rétropharyngés Submandibular lymphnode		
Ganglions mésentériques Mesenteric lymphnodes		
Ganglions hépato stomacale Hepato Stomach lymphnode		
Rate spleen		
Poumons lungs		
Cœur heart		
Pancréas pancreas		
Estomac stomach		
Foie liver		
Reins kidneys		
Face interne vessie bladder		
Articulations joints		
Autres observations other obs.		

Le score augmente en fonction du nombre ou de l'étendue des lésions : 0–1–2–3–4.

Annexe 6 : Description de la cascade de coagulation et du système du complément des vertébrés.

A) La cascade de coagulation :

Vingt molécules appelées facteurs de coagulation (FI à FXX) composent la cascade de coagulation. Elle s'active par une voie extrinsèque suivie d'une voie intrinsèque (Palta *et al.*, 2014). L'initiation de la voie extrinsèque est déclenchée par le facteur de tissu (TF) ou facteur III. C'est une glycoprotéine membranaire pro-coagulante présente dans les tissus endothéliaux et les fibroblastes. Ce facteur n'est pas exposé au sang tant qu'il n'y a pas de rupture dans les tissus vasculaires. Cependant, une fois activé, il va se lier au FVIIa et à du calcium pour promouvoir au final la conversion du facteur FX en FXa. Une fois activé, le FX et son cofacteur FV, associés à des phospholipides, vont former le complexe de prothrombinase qui convertit la prothrombine en thrombine. La thrombine va servir à cliver le fibrinogène circulant en fibrine insoluble. La seconde voie de coagulation, dite intrinsèque, est une voie parallèle, qui permet d'augmenter la génération de thrombine. Elle s'active dès que les premières molécules de thrombine sont générées grâce à la liaison du facteur FXII et de son cofacteur FX. Leur liaison entraînera l'activation du FIX pour former un complexe de phospholipides à la surface du FX. Ainsi, les 2 voies se rejoignent au moment de la formation de thrombine et de la fibrine insoluble. Au final, le maillage de fibrine créé va alors se placer autour des plaquettes pour stabiliser le clou plaquettaire et colmater la blessure.

B) Le système du complément :

Le système du complément est constitué d'une cascade de réactions catalytiques impliquant des protéines sériques. Environ 30 protéines solubles et membranaires sont impliquées dont 9 protéines majeures nommées C1 à C9, les autres sont des molécules d'activation ou des sous-produits de cette activation (Schmid-Hempel, 2011, Owen *et al.*, 2014). Trois activités principales sont attribuées au système du complément :

- Il est impliqué dans la défense innée contre les infections. En effet, le système du complément permet aux effecteurs cellulaires une meilleure reconnaissance des cellules étrangères, provoquant ainsi la lyse des membranes et l'opsonisation. Il a aussi un rôle en tant que médiateur de l'inflammation et de chimiotactisme des leucocytes grâce à la production d'anaphylatoxine (molécule permettant d'amplifier les processus inflammatoires).
- Il agit à l'interphase entre les deux types d'immunité (innée et adaptative) pour l'élimination des parasites sanguins et tissulaires, par l'augmentation de la réponse des anticorps, la mémoire immunitaire et la présentation antigénique. Il aurait également des effets stimulateurs sur la réponse des LT.

- Enfin, il est impliqué dans la phase de contraction de la réponse immunitaire. C'est la dernière phase de la réponse immunitaire, la phase de nettoyage, grâce à l'élimination des cellules apoptotiques et des complexes immuns tissulaires créés lors de la réponse immune (Anderson & Valenzuela, 2008, Owen *et al.*, 2014).

Annexe 7 : Articles

Articles

A. Effect of *O. porcinus* tick salivary gland extract on the African swine fever virus infection in domestic pig

Jennifer Bernard¹, Evelyne Hutet¹, Frédéric Paboeuf¹, Tantely Randriamparany², Philippe Holzmüller³, Renaud Lancelot³, Valérie Rodrigues³, Laurence Vial³, Marie-Frédérique Le Potier^{1&*}

¹ Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Unité Virologie et Immunologie Porcines, Zoopôle Les Croix, BP53, 22440 Ploufragan, France

² Laboratoire National de Diagnostic Vétérinaire, Antananarivo, Madagascar

³ CIRAD BIOS, UMR15 CIRAD/INRA "Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Emergentes". Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier cedex 5, France

* Corresponding author

E-mail: marie-frederique.lepotier@anses.fr

Soumis à PlosOne le 7/10/15

Accepté le 13/12/15

<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0147869>

RESEARCH ARTICLE

Effect of *O. porcinus* Tick Salivary Gland Extract on the African Swine Fever Virus Infection in Domestic Pig

Jennifer Bernard^{1,3}, Evelyne Hutet¹, Frédéric Paboeuf¹, Tantely Randriamparany², Philippe Holzmüller³, Renaud Lancelot³, Valérie Rodrigues³, Laurence Vial³, Marie-Frédérique Le Potier^{1*}



1 Unité Virologie et Immunologie Porcines, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Agence Nationale de Sécurité Sanitaire (Anses), Univ Bretagne Loire, Ploufragan, France, **2** Laboratoire National de Diagnostic Vétérinaire, Antananarivo, Madagascar, **3** UMR CMAEE "Contrôle des maladies animales exotiques et émergentes", Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement (CIRAD), Montpellier, France

* marie-frederique.lepotier@anses.fr

OPEN ACCESS

Citation: Bernard J, Hutet E, Paboeuf F, Randriamparany T, Holzmüller P, Lancelot R, et al. (2016) Effect of *O. porcinus* Tick Salivary Gland Extract on the African Swine Fever Virus Infection in Domestic Pig. PLoS ONE 11(2): e0147869. doi:10.1371/journal.pone.0147869

Editor: Pedro L. Oliveira, Universidade Federal do Rio de Janeiro, BRAZIL

Received: October 7, 2015

Accepted: December 13, 2015

Published: February 1, 2016

Copyright: © 2016 Bernard et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was partly funded by the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under Grant agreement no.311931 – ASFORCE, the General Council of the Côtes d'Armor department and the Regional Council of Languedoc Roussillon (Chercheur d'avenir project). JB received her Ph.D. grant from CIRAD and ANSES. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

African swine fever is a haemorrhagic disease in pig production that can have disastrous financial consequences for farming. No vaccines are currently available and animal slaughtering or area zoning to restrict risk-related movements are the only effective measures to prevent the spread of the disease. *Ornithodoros* soft ticks are known to transmit the African swine fever virus (ASFV) to pigs in farms, following the natural epidemiologic cycle of the virus. Tick saliva has been shown to modulate the host physiological and immunological responses during feeding on skin, thus affecting viral infection. To better understand the interaction between soft tick, ASFV and pig at the bite location and the possible influence of tick saliva on pig infection by ASFV, salivary gland extract (SGE) of *Ornithodoros porcinus*, co-inoculated or not with ASFV, was used for intradermal auricular inoculation. Our results showed that, after the virus triggered the disease, pigs inoculated with virus and SGE presented greater hyperthermia than pigs inoculated with virus alone. The density of Langerhans cells was modulated at the tick bite or inoculation site, either through recruitment by ASFV or inhibition by SGE. Additionally, SGE and virus induced macrophage recruitment each. This effect was enhanced when they were co-inoculated. Finally, the co-inoculation of SGE and virus delayed the early local spread of virus to the first lymph node on the inoculation side. This study has shown that the effect of SGE was powerful enough to be quantified in pig both on the systemic and local immune response. We believe this model should be developed with infected tick and could improve knowledge of both tick vector competence and tick saliva immunomodulation.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Complex interactions have been described in many host-vector-pathogen associations. Most of these associations are highly adaptive, especially for vectors and pathogens that try to escape host defence responses by particular behavioural or immunological control strategies [1].

Ticks play an important role in pathogen transmission and emergence and are considered of great importance in veterinary and public health domains [2]. As blood-feeding parasites, ticks have to develop high plasticity and resistance to host immune systems to achieve complete engorgement. Indeed, the host reacts to the dilacerations of its own skin barrier by ticks' mouthparts and activates an early response to infestation at the bite site [3]. This immune response involves haemostasis and inflammation modulation, as well as the development of cellular and humoral responses through the early recruitment of mononuclear phagocytic cells and polymorphonuclear cells, the maturation of antigen-presenting cells (APCs), the activation of mast cells, and other modulation of antibodies, cytokines, chemokines and the complement system [4,5]. At the same time, ticks produce pharmacologically active molecules in their saliva to escape host immune defences [6], incidentally improving pathogen transmission [7].

African swine fever (ASF) is a disease with disastrous economic consequences in pig production that can be transmitted by several soft tick species of the *Ornithodoros* genus (Acari, Argasidae). ASF is caused by a DNA virus of the *Asfarviridae* family [8], which induces lethal haemorrhagic fever in domestic pigs. Quarantine of the affected areas and the slaughtering of infected or suspicious animals are currently the only reliable control strategies [9]. ASF is highly contagious among pigs and the ASF virus (ASFV) can persist in the environment and fomites for weeks or even months. *Ornithodoros* ticks such as *Ornithodoros erraticus* in Spain and Portugal, and *O. moubata sensu lato* in eastern and southern Africa, are able to maintain and transmit the virus, and are competent vectors and reservoirs for ASFV [10]. These ticks can maintain ASFV for years and transmit the virus through different routes such as transovarial and/or sexual transmission from tick to tick, as well as horizontal transmission to suids via contaminated saliva or coxal fluid [11]. Given their endophilous lifestyle, *Ornithodoros* ticks are sedentary and greatly dependent on their host habitat [12].

During the early stage of pig infection with ASFV, mononuclear phagocytic cells are the main targets for viral replication [13]. At the inoculation site, ASFV induces the recruitment of macrophages, as well as their maturation, and phagocytic and secretory activation [13], through increased production of cytokines such as TNF- α , IL-1 and IL-6 [14,15]. Macrophages have essential functions in the host innate immune response and in the modulation of inflammation and maintenance of skin homeostasis [16,17]. Other important immune target cells for ASFV replication are APCs, particularly Langerhans cells (LC), which have a sentinel role in the skin. Following infection, APCs mature in interdigitating dendritic cells and present ASFV antigen in lymph nodes [18]. However, specific ASFV contamination through tick bites and the action of tick saliva on ASFV infection in pigs have never been described. Only two studies investigated immunomodulation due to *O. moubata* saliva [19,20] but not in relation to ASFV or other pathogen transmission. For several other tick-borne diseases, tick saliva was described as impairing the chemo-attraction or maturation of macrophages, altering the function of dendritic cells (DCs) in the transportation of nonself antigens or reducing the ability of lymphocytes to proliferate [6,21,22]. Modulation of the production of cytokines, such as TNF- α , IFN- γ or IL-10, was also reported [4,23]. In the specific case of ASFV vectorial transmission, similar patterns can be predicted with greater complexity, since these cells are also the main target of ASFV.

Since monocytes-macrophages and other APCs are recruited early when skin aggression or infection occur [5], LCs are at the first line of defence, triggering the local immune response and playing a key role in the achievement of the blood meal for ticks, and since monocytes-

macrophages and APCs are the target cells for ASFV replication [13,24], we chose to focus our study on LCs and macrophage cells. The aim of this work was thus to determine whether the saliva of *O. porcinus* (belonging to the *O. moubata* complex of species) was able to modulate the immune response of domestic pigs infected by ASFV, using the intradermal injection of tick salivary gland extract (SGE) in the presence or absence of ASFV. Our observations focused both on the pig systemic immune response and on pig skin inflammation and cellular modulation (especially LCs and macrophages) at the tick bite location. Unlike previous studies, the assessment of such immune modulations was conducted on the natural hosts, domestic pigs, for soft tick vectors or ASFV and using what we believe to be a highly adapted tick-virus association with *O. porcinus* ticks collected from Madagascar and a Madagascan ASF virus strain.

Materials and Methods

ASF virus isolate

The highly pathogenic ASFV isolate Ambaton02 (GenBank accession number BankIt1774827 ANSES-MADA68322 KP144287) was originally isolated from an infected domestic pig in Ambatondrazaka, Madagascar, in 2002 and kindly provided by the Direction de la santé animale et du phytosanitaire (DSAPS)—Ministère de l'agriculture de l'élevage et de la pêche, Antananarivo, Madagascar. The Ambaton02 isolate was classified as a haemadsorbing ASFV strain belonging to the genotype II [25]. It was passaged three times in primary porcine alveolar macrophages before use in this experiment.

Soft ticks

Ornithodoros porcinus domesticus ticks were collected from pig pens in Madagascar between 2006 and 2010, under the supervision of DSAPS. ASFV DNA was detected naturally in some specimens, using PCR [26]. A review of the literature indicated that this species was able to maintain and transmit ASFV [27,28]. The ticks used for this study were shown to be ASFV-free before being reared at CIRAD, Montpellier, France. They were regularly fed on artificial membrane with heparinised blood [29] and kept at 24°C, in 85% relative humidity, to complete the developmental cycle from nymph to adult stage.

For the experiments, 5 adult ticks were placed together in a Petri dish covered with a piece of mosquito netting, to allow the ticks to bite the pig through the fabric. This device was attached to the ear of a pig with adhesive tape for 2 hours to allow the ticks enough time to complete their blood meals. Another group of unengorged adult ticks was used to prepare the salivary gland extract (SGE). They were dissected and salivary glands were removed, each gland was crushed in 400 µL of Minimum Essential Medium (MEM) (BE12-611F, Ozyme, France), and the homogenates were clarified by centrifugation before inoculation. One adult tick SGE was chosen to simulate two feeding ticks.

Pigs

Forty-eight Large-White pigs were obtained from the specific pathogen-free (SPF) breeding facilities at ANSES, Ploufragan, France. Pigs of both sexes were eight weeks old and weighed 30–35 kg at the time of inoculation. The experiment was performed in accordance with EU and French regulations on animal welfare in experimentation. The protocol was approved under number 20/12/12-15, by the French ethical committee for animal experimentation, named ComEth-Anses/ENVA/UPEC (agreement C2EA-16, Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche, Paris, France). The procedure for the euthanasia of the animals was based on an accepted method included in European Directive 2010/63/EU, using an

Table 1. Number of pigs per trial, treatment group and time post inoculation.

Group	ID ASFV		ID ASFV+SGE		TICK	ID SGE	ID MEM	NEG
ASFV inoculation	HD trial	LD trial	HD trial	LD trial	No	No	No	No
Nb of pig at 1hpi	9	6	9	6	10	3	1	4
Nb of pig at 48hpi	6	4	6	4	8	2	0	4
Nb of pig at 5–8 dpi	3	2	3	2	6	0	0	4

Nb: number (of pig alive); hpi: hours post-inoculation; dpi: days post-inoculation.

doi:10.1371/journal.pone.0147869.t001

anaesthetic overdose of 20 mg of sodium thiopental per kilogram of weight, administered via the vena cava. All the pigs were maintained at BSL-3 security facilities throughout the experiment and fed *ad libitum*.

Experimental design and trial monitoring

The pigs were divided into 6 groups (Table 1). Two groups of pigs received an intradermal inoculation in one ear with virus alone (ID ASFV), or with virus and SGE (ID ASFV+SGE). In addition, four groups of pig did not receive any virus: i) one group was bitten by ASFV-free ticks (TICK), ii) one group received an intradermal inoculation of SGE (ID SGE), iii) one group received an intradermal inoculation of medium (ID MEM) and iv) one group was the negative control group (NEG).

Except for the NEG group, each pig received 5 intradermal inoculations of 200 μ l, or 5 ticks, on one ear. The other ear was kept as an internal control to account for individual variations of cell counts (macrophages and Langerhans cells). For both the ID ASFV and ID ASFV+SGE groups, 18 pigs received 10^4 50% haemadsorbing doses (HAD₅₀) per pig called the high ASFV dose (HD) trial and 12 pigs received 10^2 HAD₅₀/pig, called the low ASFV dose (LD) trial (Table 1).

The pigs were monitored daily as previously described [30] for rectal temperature and clinical signs (inappetence, recumbancy, skin haemorrhage, joint swelling, laboured breathing and/or coughing, ocular discharge, diarrhoea, blood in urine, vomiting), which were recorded and scored according to a scale from 0 to 5 per sign. The pigs were weighed regularly and before euthanasia. Apart from the NEG group, one to three pigs were slaughtered at 1 hour and 48 hours post inoculation (pi) in each group of pigs (Table 1). The other pigs were slaughtered between 5 and 8 days pi (dpi), as soon as the clinical score was equal or higher than 15. On post-mortem examination, gross lesions were observed and scored.

Sample collection

Blood samples were collected before inoculation and then at least twice a week depending on the group, for several uses: (i) on heparin (Vacuette 9 ml clinical chemistry, lithium heparin Greiner Bio-One, Dutscher, France) for virus isolations, (ii) on EDTA (Vacuette 4 ml haematology, EDTA-K3 Greiner Bio-One Dutscher, France) for blood cell numbering (MS9 hematology analyzer, Melet Schloesing Laboratoires, Osny, France) and for ASFV genome real-time PCR detection.

Serum samples were purified from coagulated blood samples in dry tubes (Vacuette 8 ml Z Serum Sep Clot Activator, Greiner Bio-One, Dutscher, France) by centrifugation at 3000 g for 5 min for cytokine quantification.

Lymphoid organs (spleen, tonsils and parotid lymph nodes) were collected at necropsy for virus detection.

Both ears of each pig were collected less than 15 min after euthanasia to investigate local immune response. Two skin biopsies were taken per ear using 8 mm punches, fixed in 4% paraformaldehyde overnight, immersed in 10%, 20% and 30% sucrose baths and snap-frozen in OCT compound (MM-France, Francheville, France). Serial cryosections (12 μ m) were performed using a cryomicrotome (Microm HM 505 E-VAC, Francheville, France). Slides were air-dried and labelled with anti-swine antibodies (Ab) and isotype-specific secondary antibodies and isotype control (IgG2b and IgG1, Dako, Les Ulis, France) for the immuno-histological study. Two other biopsies per pig were post-fixed in 4% paraformaldehyde overnight and embedded in paraffin according to the routine method applied at Laboce 22 (Ploufragan, France) for histological lesion analysis by a pathologist.

Virus detection

Virus isolation on a heparin blood sample was performed as described in the OIE diagnostic manual [31]. The absence of any antagonist effect of SGE on the virus isolation was verified on pig alveolar macrophages (data not shown). Virus detection was carried out by real-time PCR as previously described [32] on EDTA blood samples and organs, after DNA extraction with the DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). For each pig euthanized at 48 hpi, four separate samples used for DNA extraction from the parotid lymph node on the side of the inoculated ear (PLI). A sample of spleen, tonsils, and two different samples of parotid lymph nodes from the opposite side (PLO) were extracted. Organs that were late positive for ASFV by real-time PCR ($C_t > 40$) were further analysed by a haemadsorption assay (HAD) using SPF primary porcine alveolar macrophages in a 96-well plate [31].

Viral genome loads, quantified by the cycle number threshold (C_t) detected by real-time PCR, were categorized as i) negative ($C_t > 45$), ii) weakly positive, close to the real-time PCR detection threshold ($37 < C_t \leq 44$), iii) positive ($26 < C_t \leq 36$) and iv) strongly positive ($15 < C_t \leq 25$).

Porcine cytokine quantification

In pig sera, IL-6, IL-12 and TNF- α were measured using ready-to-use ELISA kits (R&D systems, Minneapolis, USA) and haptoglobin quantification was carried out with the TRIDELTA Development LTD kit, (Eurobio, Courtaboeuf, France). IFN- α was quantified by a homemade ELISA test as previously described [33].

Immunofluorescence (IF) and histological staining on skin biopsies

For IF, non-specific binding of antibodies (Ab) to tissue sections was blocked for 1 h in PBS containing 3% goat serum albumin (GSA). Slides were incubated overnight with primary monoclonal antibody (mAb) in PBS containing 10% GSA and 0.03% Triton X100, then washed in PBS baths and incubated for 2 h with secondary Abs (Alexa Fluor[®] goat anti-mouse, Invitrogen) at room temperature. Finally, Hoechst stain solution (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) was added to the slides after PBS washes. Sections were mounted in Mowiol 4–88 medium (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) for analysis using a fluorescent microscope. Microscopy observations were performed with an Olympus BX41 epifluorescence microscope (Scop Pro, Itteville, France). Images were recorded on an EXI Aqua camera (QImaging, Surrey, Canada) using Image Pro-Plus software (Media Cybernetics). Twelve serial skin sections of each of the 66 biopsies were systematically examined and pictures were taken of representative sections. Ten to 25 fields were captured from comparable regions of dermis in each biopsy at the same exposure and magnification by chromatic filter for panorama reconstruction. Autofluorescence intensity was subtracted before picture analysis. Manual counting of Langerhans cells (LC) was carried out by SWC3-Ab

labelling (SWC3/CD172, IgG2b, porcine pan-myeloid, Clone 74-22-15A, SouthernBiotech) and by morphological discrimination on all epidermis transects of the opposite ear and above the injured transect of the inoculated ear. LC density was expressed as $\text{LC } \mu\text{m}^{-1}$. We systematically delineated rectangular counting frames of identical areas to assess the density of cells per frame. Macrophages were manually counted by co-labelling using SWC3-Ab and CD163-Ab (IgG1, Monocytes and macrophages, Clone MCA2311, AbD serotec) in 4 rectangular counting frames on the opposite ear: two in the dermis and the other two in deep dermis, and on the observed lesion area made by the needle or the tick bite for the inoculated ear (S1 Fig).

Haematoxylin-Eosin and saffron staining was used for histological lesion descriptions and scored using a semi-quantitative method according to severity and intensity of the lesions as oedema (1–3), haemorrhage (4–6), inflammation (7–9), dermatitis (10–12), or necrosis (13–15). A descriptive analysis of 64 biopsies was performed on the mean total score per pig group.

According to observations of histological lesions and LC distribution along the epidermis before counting, biopsies were distributed in 5 patterns: i) “Mechanical” class, which included biopsies with epidermis disruption caused by needle introduction or tick mouthparts; this class was characterized by a total absence of LCs in the disrupted region and normal density at each extremity, ii) “Physiological” class, which showed a disappearance of LCs above the lesion with gradual reparation on both sides, iii) “Scab” class, which corresponded to phenomena of wound healing; there were no LCs under the scab and gradual reparation on both sides, iv) “Deep” class, which only concerned inoculated groups with lesions in deep dermis but a non-modified LC distribution, and v) “No-effect” class, which presented a normal distribution of LCs above the lesion in the dermis.

Statistical Analysis

We fitted statistical models to the available data, thus utilizing most of the data and limiting the number of tests. In all the models the factors of interest were the ASFV dose (categories: no ASFV, low ASFV dose, high ASFV dose), tick saliva (categories: no saliva, tick bite, salivary gland extract) and time after inoculation (categories: 1 hpi and 48 hpi).

For the rectal temperature and clinical scores, preliminary exploratory data analyses revealed sigmoid patterns for the response, with a delay before the onset of the response, followed by a steep rise and a plateau preceding the agonic stage. To model this pattern, we used a 3-parameter nonlinear logistic model [34]. The first parameter (θ_1) was the plateau value (horizontal asymptote when time increased); the second parameter (θ_2) was the inflection point of the response curve; the last parameter (θ_3) was a shape parameter (steepness of the curve around the inflection point). As the rectal temperature showed between-pig variations (range: 39.1–39.8°C on the day of experimental infection), we modelled the temperature change from the inoculation day, rather than the actual rectal temperature.

The nonlinear logistic models were fitted using generalized least-squares (GLS), which provided maximum-likelihood (ML) estimators. During the model building stage, this property was used to compare fitted models with the Akaike information criterion (AIC) corrected for the small sample size [35,36]: $\text{AIC} = -2 \log(L) + 2k$ and $\text{AICc} = \text{AIC} + 2k(k+1)/(n-k-1)$, where L was the maximized likelihood, n was the number of observations and k was the number of parameters (coefficients) in the model. AICc was used to compare models with the same response. Comparable models with lower AICc were considered as better than those with higher values.

Moreover, the GLS estimation method made it possible to account for correlations in the model residuals related to repeated measurements made on the same pigs, as well as possible heteroscedasticity in these residuals [34]. The pig was defined as a grouping factor, and a homogeneous within-pig correlation structure was used for residuals.

For the detection of ASFV DNA in parotid lymph nodes with real-time PCR, we considered the cycle number threshold (C_t) as a quantitative variable. We were also confronted with repeated measurements in this analysis, with several values of C_t recorded on the same lymph node, and two parotid lymph nodes per pig. We used a two-level linear mixed-effect model [37], with ASFV dose, tick saliva and time as the fixed effects, and two nested random effects (grouping factors) associated with the intercept: (i) pig, and (ii) parotid lymph node within pig. Models were fitted with an ML method [34].

For the analysis of Langerhans cells and macrophage density, the within-pig correlation of residuals was removed, taking each pig as its own control. Indeed, for each pig i , we computed:

- The cell density (Langerhans cells or macrophages) in non-inoculated (control) ears: $d_{i,ref} = \sum_i Y_{i,ref} / \sum_i Z_{i,ref}$ where $y_{i,ref}$ was the cell count in region $Z_{i,ref}$. For Langerhans cells, $Z_{i,ref}$ was a line transect of known length ($Z_{i,ref}$) located in the epidermis. For macrophages, it was a counting frame of known area ($Z_{i,ref}$).
- The cell density in inoculated (treated) ears: $d_{i,obs} = \sum_i Y_{i,obs} / \sum_i Z_{i,obs}$. For Langerhans cells, $Z_{i,obs}$ was a transect line segment chosen just above the inoculation point. For macrophages, the counting frame was selected close to the inoculation point in an area with a higher macrophage density as determined after a preliminary visual inspection.
- The difference in cell density $\delta_i = d_{i,ref} - d_{i,obs}$. A positive value of δ_i indicated a decrease in cell density. This difference in cell density was the response in subsequent statistical models.

We used linear models with adaptations required by response peculiarities. Indeed, δ_i was a difference of cell counts which typically showed a high range of values, with outliers (observations very different from the population mean). To account for this, we used a robust linear model, in which outliers had a limited influence on coefficient estimates [38].

Model coefficients were fitted by iterated re-weighted least squares. Moreover, because of the small sample size (24 pigs allocated to different treatment categories), it was difficult to use the asymptotic condition for the computation of p values associated with tests on model coefficients. Instead, we used a bootstrap procedure on model residuals as described by Davison and Hinkley [39]. In short, the estimated coefficients (robust linear model) and fitted values were considered as fixed values. Residuals were sampled with replacement, and a new response was computed adding the fitted values to the sampled residuals. The robust linear model was then refitted with this new response, and the resulting coefficients were stored. This loop was iterated B times (with large values of B : typically 999 or 1,999, or more). The B sets of coefficients were added to the original set. The 2.5% and 97.5% quantiles of each coefficient series of $B+1$ values (or linear combination of these coefficients) were then used as 95% confidence intervals.

For instance, the fitted mean difference in cell density $\hat{\delta}_i$ was a linear combination of model coefficients. To know whether the combined effects of time, ASFV dose and tick saliva (including possible interactions) significantly altered $\hat{\delta}_i$ (null hypothesis: $\hat{\delta}_i = 0$), we computed the $B+1$ values for a given group (e.g. tick saliva and high ASFV dose at 48 hpi), and assessed whether the 95% confidence interval included the value of 0 (non-significant combined effect for $\alpha = 0.05$) or not (significant combined effect for $\alpha = 0.05$).

Results

General pig immune response: clinical signs and pathophysiology

1. Clinical scores and viraemia. Symptoms were only observed when the virus was inoculated, with no clinical signs for the NEG, TICK and ID SGE groups throughout the experiment.

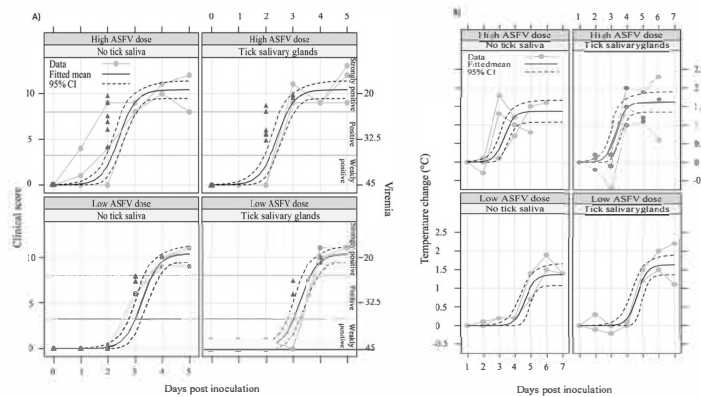


Fig 1. Clinical scores, viraemia and rectal temperature. (A) The scale for clinical score is shown on the left, and the scale for individual real-time PCR results is shown on the right. Real-time PCR results (dark grey triangles) were categorized as negative ($C_t > 45$), weakly positive ($44 \geq C_t > 37$), positive ($36 \geq C_t > 26$) and strongly positive ($C_t < 25$). (B) Changes in pig rectal temperature were recorded with respect to the inoculation day. The mean was estimated with a nonlinear logistic model fitted by generalized least squares.

doi:10.1371/journal.pone.0147869.g001

The disease spread and clinical scores were similar between intradermally infected groups whatever the virus doses (HD and LD trials), including first a loss of appetite at 1–3 dpi, then hyperthermia the following day, at 2–4 dpi. Pigs that received the high ASFV dose were all euthanized 5 or 6 dpi for ethical reasons, whereas the pigs inoculated with the lowest dose had to be euthanized at 8 dpi. The onset of the disease, according to the clinical scores, was significantly delayed by one day in the LD trial compared to the HD trial ($p = 5 \cdot 10^{-3}$). The mean daily weight gain (MDWG) was evaluated and all the infected groups (ID ASFV, ID ASFV+SGE) lost weight from 3 dpi whatever the virus doses expressed in mean \pm standard deviation (SD), -0.9 ± 0.1 (n = 5) kg/day for the HD trial and -0.7 ± 0.1 (n = 4) kg/day for the LD trial, whereas the non-infected groups (NEG, TICK, ID SGE, ID MEM) gained weight up to 8 dpi (0.9 ± 0.1 (n = 7) kg/day).

The body temperature indicated that the pigs of the non-infected groups never displayed hyperthermia ($T > 40^\circ\text{C}$). For the other groups, the onset of fever occurred with a significant one day delay between pigs of the HD trial at 3.3 dpi and the LD trial at 4.6 dpi ($p < 10^{-3}$, non-linear logistic model) (Fig 1B). In the HD and LD trials, higher mean rectal temperatures were observed for the ID ASFV+SGE groups over the first three days after the onset of hyperthermia. To assess this effect, we considered both groups together and analysed the temperature data on the first three days after the onset of hyperthermia. We fitted the mean temperatures with a generalized least squares linear regression model with a single fixed effect (tick saliva vs. no tick saliva) and pig as the grouping factor (within-pig homogeneous correlation structure). The fitted mean temperature of the ID ASFV+SGE group was significantly higher by 0.3°C ($p = 0.032$) than for the ID ASFV group.

The virus was detected in blood as early as 2 dpi whatever the virus dose. The virus load was scored as “positive” to “strongly positive” for the 12 pigs slaughtered at that time in the HD trial, but “weakly positive” for 5 out of the corresponding 8 pigs in the LD trial and “negative” for the last 3 pigs. This difference in detection level between trials was also found at 3 dpi. Then, from 4 dpi to the endpoint, no difference was found between groups, with or without SGE, in both trials (Fig 1A, left scale).

Table 2. Blood leucocyte mean count kinetics ($\times 10^6$ cells/ml of blood) presented in relation to hyperthermia.

Group	ID ASFV		ID ASFV+SGE		ID SGE*
	HD trial	LD trial	HD trial	LD trial	No
ASFV inoculation					
Leucocyte count before hyperthermia ¹	7.4 \pm 2.2	10.7 \pm 2.3	9.2 \pm 0.7	8.3 \pm 2.4	11.1 \pm 5.6
Leucocyte count the day of hyperthermia ²	7.9 \pm 2.1	5.4 \pm 0.7	4.8 \pm 1.5	5.5 \pm 0.2	11.7 \pm 4.7
Leucocyte count after hyperthermia ³	17.4 \pm 5.6	13 \pm 7.9	16.1 \pm 6.6	13.8 \pm 7	14.9 \pm 5.5

Data in $\times 10^6$ cells/ml of blood, Mean \pm SD;

¹: Incubation time before the onset of hyperthermia;

²: day of the onset of hyperthermia;

³: time after the onset of hyperthermia up to the end of the experiment,

*ID SGE group did not display hyperthermia, so results were separated in 3 periods of 2 days from 0 dpi to 6 dpi.

doi:10.1371/journal.pone.0147869.t002

2. Blood leukocyte count. Peripheral white blood cell counts for lymphocytes, monocytes and granulocytes were similar between pig groups before virus inoculation. Leucopenia was observed at the onset of hyperthermia in all groups of infected pigs and showed a similar pattern with a recovery period during the hyperthermia phase (Table 2).

3. Gross pathological lesions. Post-mortem examination did not reveal any difference between ASFV infected groups, with jaundice and splenomegaly systematically observed at 5–8 dpi. The most recurrent lesions for 15/20 pigs were severely congested or haemorrhagic lymph nodes. When pigs were slaughtered at 1 hpi, no lesions were recorded. A slight difference was observed at 48 hpi in the HD trial, with less reactive lymph nodes for the ID ASFV group than for ID ASFV+SGE, which also showed petechial lesions on the thymus. This distinction was not found for the LD trial.

4. Cytokine quantification in serum. Due to technical constraints, blood samples were only taken daily for the pigs receiving the low ASFV dose (with or without SGE). For these animals, the response pattern was similar for IL-12, IFN- α and TNF- α (S2 Fig, columns 2 and 4): a rise in cytokines was observed at 4 dpi. Because of the sampling framework, we could only assess the effect of the ASFV dose for animals receiving SGE (S2 Fig, columns 3 and 4). At 3 dpi, an increase in the TNF- α level was found in the HD trial, whereas it was significantly delayed by one day in the LD trial ($p = 0.02$, Wilcoxon test). The same pattern was observed for IFN- α , IL-12, and I-L6. A rise was also observed for haptoglobin (data not shown) but it remained under the positivity threshold recommended by the manufacturer for detecting inflammation.

5. Virus detection in organs. At 1 hpi, no viral genome was detected in any lymphoid organ. Conversely, all pigs euthanized at 5–8 dpi presented a very high level of viral genome in their lymphoid organs. The results were more heterogeneous when pigs were euthanized at 48 hpi. In parotid lymph nodes (Fig 2), the viral load was higher in the high ASFV dose trial than in the low ASFV dose trial, for each side (inoculated or opposite side). However, this effect was not significant (t test, $df = 7$, $t = -1.90$, $p = 0.10$).

For opposite parotid lymph nodes (PLO), no difference was observed between the ID ASFV group and the ID ASFV+SGE group (Fig 2A, Wald test, $w = 0.016$, $df = 1$, $p = 0.90$). For inoculated parotid lymph nodes (PLIs), SGE had a large and significant effect (Fig 2A, Wald test: $w = 4.6$, $df = 1$, $p = 0.031$). The IF method on lymph node cryosections confirmed that PLIs of the ID ASFV group presented more labelled cells for the ASFV VP72 virus capsid protein than the ID ASFV+SGE group on a similar area of lymph node section (Fig 2B and 2C).

For the spleen and tonsils, no effect of SGE was observed (data not shown).

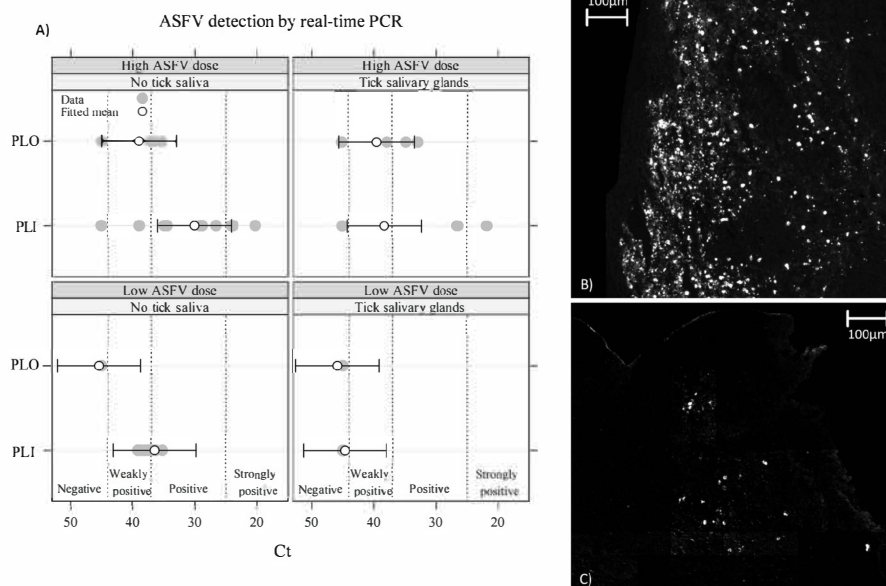


Fig 2. Viral detection in parotid lymph nodes at 48 h pi. (A) Quantification of ASFV DNA using real-time PCR. Real-time PCR results were categorized as negative ($C_t > 45$), weakly positive ($44 \geq C_t > 37$), positive ($36 \geq C_t > 26$) and strongly positive ($C_t < 25$). The mean was fitted with a linear mixed-effect model. (B) Virus labelling at 48 h pi in parotid lymph nodes (inoculation side) for pigs receiving a high ASFV dose alone. (C) Virus labelling at 48 h pi in parotid lymph nodes (inoculation side) for pigs receiving a high ASFV dose and tick salivary gland extract. Virus protein VP72 was labelled by immunofluorescence. PLI: parotid lymph node on inoculation side; PLO: parotid lymph node on opposite side.

doi:10.1371/journal.pone.0147869.g002

Local immune response of pigs: lesions and cell recruitment in auricular skin

1. Auricular biopsy lesions. One hour pi, macroscopic lesions were greater for the TICK group than for the inoculated groups, with a well characterized inflammation ring of 0.8 ± 0.2 ($n = 19$) and 0.4 ± 0.1 ($n = 25$) mm in diameter (mean \pm SD) (t test, $df = 23.5$, $t = 6.6$, $p = 9 \times 10^{-7}$). This difference was more striking at 48 hpi, 1.9 ± 0.5 ($n = 19$) and 0.4 ± 0.1 ($n = 28$) mm in diameter (t test, $df = 19.5$, $t = 11.9$, $p = 2 \times 10^{-10}$) (S3 Fig). At the endpoint of the experiment, no more macroscopic lesions were observed except for the ID ASFV and ID ASFV+SGE groups, which only displayed yellowish pigmentation of the skin.

This observation was partially confirmed by lesion scoring. At 1 h pi, the lesion scoring by groups was slightly different, with a mean value of 17.1 for the TICK group compared to 13.3 for the ID ASFV group, 10.0 for the ID ASFV+SGE group and 6.5 for the ID SGE group (Kruskal-Wallis $\chi^2 = 7.3$, $df = 3$, $p = 0.06$). At 48 hpi, the mean value of lesion scoring was 21.7 for the TICK group and 21.6 for the ID ASFV+SGE group, 13.8 for the ID ASFV group, and 11.0 for the ID SGE group, but there was no significant difference between groups (Kruskal-Wallis $\chi^2 = 3.8$, $df = 3$, $p = 0.28$). From 5 dpi to 8 dpi, lesion scoring was 22.8 for the ID ASFV group and 17.3 for the ID AFSV+SGE group, while it declined to 12.0 for the TICK group (no result for the ID SGE group) and displayed an almost significant difference (Kruskal-Wallis $\chi^2 = 5.4$, $df = 2$, $p = 0.06$).

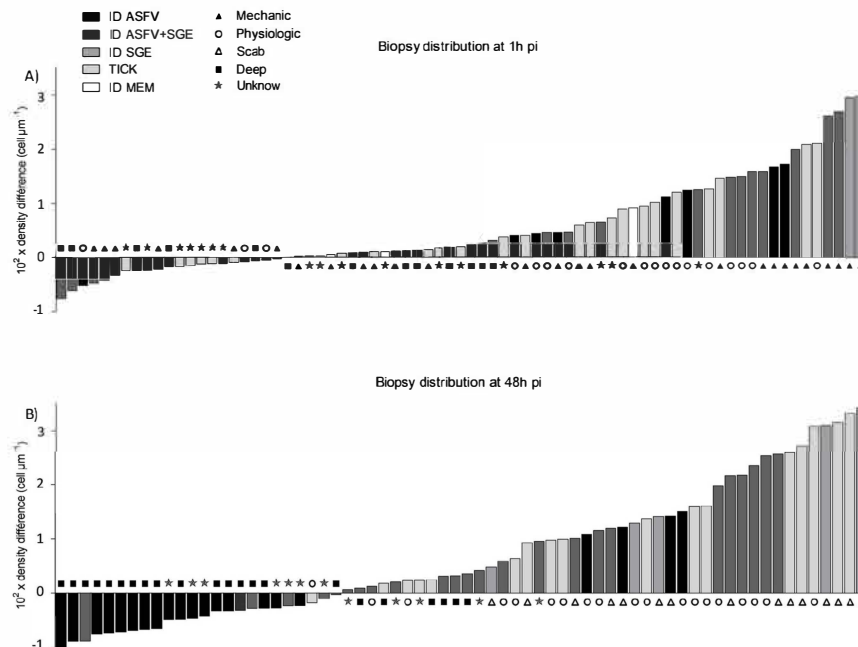


Fig 3. Classification of biopsies by Langerhans cell density differences and associated histological lesion pattern. (A) Classification of biopsy at 1 h pi. (B) Classification of biopsy at 48 h pi. Results of manual count and observation carried out on each slide. Two main lesion patterns were observed, one due to the tick bite or to the intradermal inoculation (pattern: mechanical or deep) and the other due to the physiological effect of saliva, SGE and virus (pattern: no-effect, physiological or scab).

doi:10.1371/journal.pone.0147869.g003

2. Langerhans cell density. Preliminary investigations revealed no difference in Langerhans cell (LC) density between tick bites or SGE inoculation. These two groups of pigs were therefore grouped together in the tick saliva category. The main results are shown in Figs 3 and 4A.

At 1 hpi, changes in LC density were related to all types of epidermis disruption except scabs (Fig 3A), independently of ASFV or tick saliva conditions. Indeed, no significant difference in LC density was detected between the pigs in any group: Fig 4A, second row of each group, Monte Carlo simulation, $B = 1,999$, $p > 0.05$.

At 48 hpi, most of the slices showing a decrease in LC density were from animals that received tick saliva (ID ASFV+SGE, ID SGE, TICK): Fig 3B, right-hand side. Those with the largest decrease (32/44) were categorized in the “Scab” or “Physiological” classes. Slices showing an increase had mostly been taken from pigs receiving ASFV only (Fig 3B, left-hand side). Most of them were categorized in the “Deep” class (16/24). The results from the robust linear model showed significant interaction between tick saliva and time (48 hpi): Monte Carlo simulation, $B = 1,999$, $p = 0.006$. As shown in Fig 4A, saliva significantly decreased LC density for any ASFV dose (including no virus): right-hand column, first row of each group, Monte Carlo simulation, $B = 1,999$, $p < 0.05$. For pigs which did not receive tick saliva (Fig 4A, left-hand column, first row of each group), the presence of ASFV tended to increase LC density, with a higher density for the higher ASFV dose. However, this effect was not significant (Monte Carlo simulation, $B = 1,999$, $p > 0.05$).

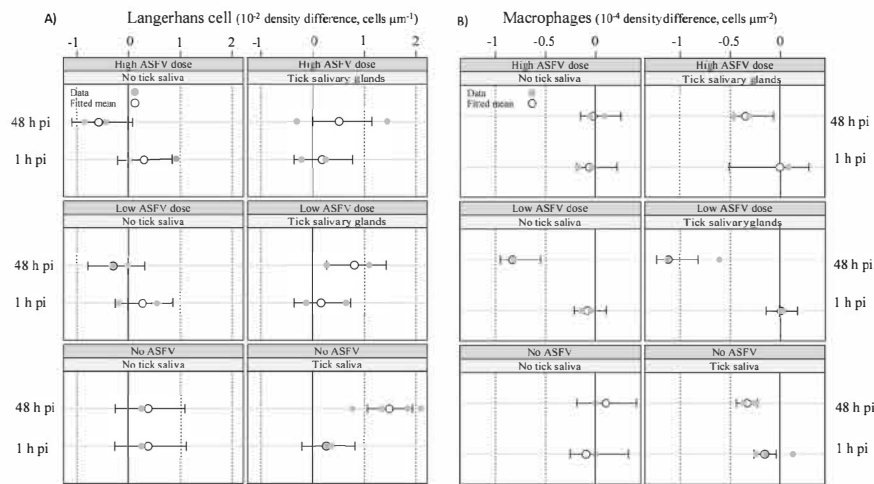


Fig 4. Pattern of immunological cell density difference between inoculated ear and opposite ear. (A) Langerhans cell density difference $10^{-2} \times$ density difference, μm^{-1} . (B) Macrophage density difference $10^{-4} \times$ density difference, μm^{-2} . The mean was fitted with a robust linear model.

doi:10.1371/journal.pone.0147869.g004

3. Macrophage recruitment in the dermis. An example of histological observations is shown in [S4 Fig](#). As for LC, observations from tick bites and SGE inoculations were grouped for data analysis. The estimated macrophage density (robust linear model) did not show cell recruitment at 1 hpi in any pig groups (Monte Carlo simulation, $B = 1,999$, $p > 0.05$), with the exception of pigs receiving tick saliva alone ([Fig 4B](#)). At 48 hpi, the results showed a strong and significant interaction between the low ASFV dose and time (Monte Carlo simulation, $B = 1,999$, $p = 0.01$). In addition, the interaction between saliva and time was significant (Monte Carlo simulation, $B = 1,999$, $p = 0.03$). All pig groups receiving ASFV and/or tick saliva showed significant macrophage recruitment, except the pig group treated with a high ASFV dose without tick saliva ([Fig 4B](#), left-hand column, and first row of upper group: Monte Carlo simulation, $B = 1,999$, $p > 0.05$). The pig group that did not receive either ASFV or tick saliva did not show any macrophage recruitment ([Fig 4B](#), left-hand column, and first row of lower group: Monte Carlo simulation, $B = 1,999$, $p > 0.05$).

Discussion

The role of *Ornithodoros* ticks in the ASF epidemiological cycle is fairly well understood, whereas the effect of tick bites, infected or not, on the immune response to infection in domestic pigs has never been studied. To recreate as closely as possible natural conditions of contamination by tick bites, we selected a combination of ticks and viral isolate collected from a restricted geographical zone (Madagascar), along with intradermal administration of a low virus dose presumed to better mimic the quantity of virus inoculated by ticks during their blood meal [27]. Extracts of *O. porcinus* salivary glands were used for intradermal inoculation, as it has been previously shown that there was a good correlation between transcript and protein abundance in salivary gland and saliva [40]. This was confirmed by our experimental results, with similar LC and macrophage recruitment patterns between the SGE and TICK groups.

The disease course observed in pigs, was similar to that previously described in infection by the ASF virus using other inoculation methods (intramuscular versus oro-nasal) [41–43]. This

confirmed that the Madagascar ASFV strain therefore displayed a similar infection pattern to that described with the Georgian strain, which is phylogenetically very close [25,44].

Effect of virus dose on the kinetics of immunological and symptomatic responses in pigs

Our results showed a correlation between the dose of virus inoculated (LD/HD trials) and the time course of the effects observed, with a delay of one day in the immune response, onset of clinical signs and virus dissemination in pig at 48 hpi, as previously described [43,45]. The other result attributable to the virus dose was a difference in macrophage density detected in the skin biopsies at the inoculation point at 48 hpi. It has been shown that the virus is capable, via the caspase-3 protein, of triggering the late activation of apoptosis between 24 and 48 h after infection, enabling massive dissemination [46,47]. It may be that the biopsies analysed at 48 hpi were taken at the time of this first and intense phase of virus dissemination, in which case the local disappearance of macrophages was probably due to induced cell death. A second hypothesis concerns the kinetics of macrophage maturation: once stimulated by its interaction with a pathogen, the macrophage undergoes profound changes [46,48]. SWC3/CD172-Ab, a porcine myelomonocytic marker used, in our study, to detect macrophages [18,49], is a homologue of the epitope SIRP- α [50], whose expression is regulated according to macrophage maturation [51,52]. A high virus dose can influence LC and macrophage maturation at 48 hpi [53] and induce an extinction of the SIRP- α signal, possibly reducing the detection of these cells in our samples.

The presence of SGE modulates the immune response in pigs

1. SGE plus ASFV increased fever. The group of pigs receiving an intradermal inoculation of SGE without virus displayed similar results to those from the TICK group, whether for immune or physiological responses. When the pigs were inoculated with the virus, irrespective of the dose, SGE presence increased the degree of hyperthermia, whereas SGE did not affect the systemic level of the proinflammatory cytokines TNF- α and IL-6. The pyrogenic substance hypothesis did not therefore appear to explain this difference, but it needs to be investigated further, even though very little is currently known about fever-triggering mechanisms [5].

2. SGE had an immunomodulating effect on skin tissue lesions. During engorgement, the tick maintains a passageway to the outside via its saliva until 60 min [12], which is of greater consequence than a needle-mediated intradermal inoculation of a few seconds. This difference partly explains the results of the lesion observations at 1 hpi, for which the TICK group had a higher lesion score than the ID SGE group, a trend that was confirmed at 48 hpi. For inoculation with a virus+SGE mixture, the lesion score at 48 hpi then became equivalent to that of the TICK group, thereby showing a greater immunomodulating effect of SGE in the presence of virus. This mechanism should probably be considered jointly with the observation of greater hyperthermia in the groups of diseased pigs with SGE. To assess the scores of the biopsies at the end of the experiment (5 to 8 d pi), it should be remembered that the main symptom of the ASF virus is rapid-onset haemorrhagic fever. Thus, the higher lesion level in the ID ASFV group than in the ID ASFV+SGE group can be explained by the physiological consequences due to the fast multiplication of the virus. However, most saliva molecules enable ticks to modulate the haemostasis of their host [54] along with the associated scarring phenomena [6].

3. SGE promoted LC disappearance in the epidermis. It has been established, that LCs are recruited by the ASF virus [18,24] and their migration may depend on the production of TNF- α induced by macrophages and neutrophils [55]. Inversely, the immunomodulation by saliva at 48 hpi was reflected in a clear reduction in the number of LCs. It is quite possible that exposing

immature DCs to tick saliva leads to reduced migration and poor LC renewal [56]. In addition, LCs are sentinels with a limited radius of action from the epidermis, which are rapidly replaced by dendritic cells and macrophages in the case of deeper lesions of the dermis. The reduction observed in the ID ASFV+SGE groups was lower than for the TICK group but remained statistically similar, meaning that the salivary gland extract had an inhibiting impact on LC density, whereas it was inoculated more deeply than saliva during natural tick engorgement.

4. SGE promoted the recruitment of macrophages in the dermis. Once the epidermis and the LC barrier have been overcome, pathogens encounter a second line of defence mainly consisting of a massive arrival of immune cells (e.g. neutrophils, granulocytes then macrophages) [6,17,57,58,59]. However, the cell type involved early in the host-tick response also depends on the time since engorgement and the degree of host susceptibility [58,59]. The activity of macrophages would appear to be inhibited in susceptible vertebrate hosts during engorgement by hard ticks or SGE inoculation [22,60,61]. Only one study on the evasion strategy of *Dermacentor variabilis* shows substantial macrophage recruitment [62]. Our results showed weak macrophage recruitment at 1 hpi whichever group of pigs was studied, that was probably the direct consequence of the lesions caused by inoculation or tick engorgement [17]. Nevertheless, it clearly intensified at 48 hpi, that mean SGE and virus displayed macrophage recruitment alone or co-inoculated. The nature of activation signals received by these macrophages, being probably different in maturation or susceptibility to infection, could explain the differences observed between groups.

5. SGE delayed virus infection in the first lymph node. Once the virus enters the host organism, it spreads rapidly by way of infected antigen-presenting cells which travel via the lymph or blood towards target organs [33,62,63]. Our results indicated that dissemination of the ASFV was found to be less in the PLIs of the pigs for which the inoculum contained SGE, suggesting that saliva molecules act more on modulating APCs. Three hypotheses can be put forward to explain this early local phenomenon *in vivo*. The first is based on the idea of dilution [64], the share of APCs bearing antigens of the virus would appear to be reduced to the benefit of those bearing SGE antigens [65–67]. Marquet et al. [64] estimated that the number of LCs migrating to the lymph nodes via the lymph amounted to around 11% of the afferent DCs. It is known that APCs and especially LCs are able to present antigens of hard tick SGE to T lymphocytes in lymph nodes *in vitro* and *in vivo* [65–67]. The second more likely hypothesis would be that SGE acts on APCs via immunoregulation phenomena. Saliva molecules might induce APC cell death or inhibit their migration to the PLIs, making virus replication less efficient in the latter. However, APCs density in the lymph nodes was similar in presence or absence of SGE (S5 Fig). The third hypothesis, which does not exclude the second, depends on certain *in vitro* and *in vivo* studies showing that hard tick saliva is capable of downregulating APC functions [23,56,68]. For instance, SGE of *O. porcinus* might influence the ability of APCs to present viral antigens to T cells in lymph nodes.

Limitations and prospects

One aspect to consider in histological studies is the type of syringe administration. As we saw in our study, the inoculation depth and the concentrations inoculated are relatively dissimilar to those of tick bites [3]. In addition, the virus produced on pig macrophages did not suffer the selection pressures that its passage through the different tick tissue barriers might entail, particularly the midgut and salivary glands. However, despite these conditions, we were able to see that the effect of the virus on one hand, and the effect of SGE on the other, were strong enough to be observable and quantifiable at the inoculation point on histological sections, and physiologically in pigs. Another bias to consider was the SGE utilisation because the profile of secreted

proteins in saliva is not exactly the same. However our experimental results and statistical analysis, notably on the comparison between TICK and ID SGE group, showed that it was possible to assimilate SGE effect to saliva effect.

However, the observed immune modulations still depend on the models studied and the arthropod-pathogen-host combinations concerned [69]. Barratt-Due et al. [70] showed that the OmCI molecule present in *O. moubata* saliva is able to modulate haemostasis in pigs *in vivo*, attenuate the production of TNF- α and IL-6, and reduce neutrophil migration, whereas their previous study had shown that TNF- α was not modulated by this protein *in vitro* in pig cells [71]. Even though some common patterns seem to occur, relationships can be difficult to model, making predictions about reactions problematical. Indeed, most vectors modulate the immune system of the host, thus facilitating pathogen proliferation. Our study showed that the molecules contained in SGE may have partly caused an inhibiting effect on macrophage and APC activation. However, we saw that SGE and tick saliva increased macrophage recruitment in the dermis, which is likely to promote viral infection. Consequently, to better understand the local effect of saliva, it would be interesting to investigate, as a priority, how the bite of a tick infected with the ASFV affects modulation of the immune cells. Further research comparing expression levels for some cytokines of interest (TNF- α , IL-6, etc.) and their tissue location (dermis and lymph node), as well as the dissemination of SGE molecules in lesions, would help to verify the hypotheses put forward. Another valuable aim of further study would be to acquire the ability to keep track of changes in LCs and antigen-presenting cells. It would thus be possible to improve our knowledge of the impact of SGE on macrophage recruitment and APC exchanges with lymph nodes. Lastly, it seems important to check that the infection patterns produced are similar between the different *Ornithodoros* species of interest (*O. moubata* and *O. erraticus* in particular). The *O. erraticus* tick is known to cause greater inflammation and lesions in tissues than a bite from ticks of the *O. moubata*–*O. porcinus* complex [72]. Such a study might help to more effectively characterize immunomodulation phenomena within the same tick genus (e.g. *Ornithodoros*) in line with their vector ability.

Supporting Information

S1 Fig. Cell count method on skin biopsies from inoculated ears. Within the epidermis, the transect for the Langerhans cell count is delineated in blue. Within the dermis and deep dermis, the macrophages were counted inside the areas delineated in yellow. The circular area corresponds to the area of the tick bite or inoculation point. The yellow rectangles are outside the area where the tissue was disrupted. In the opposite ear, macrophages were only counted in the yellow rectangles as there was no tissue disruption and the transect extended throughout the biopsy.

(TIF)

S2 Fig. Cytokine response: dosage of TNF- α , INF- α , IL-6 and IL-12 in pig sera. For each cytokine, whatever the pig group and day post infection, the results were transformed into a percentage of serum concentration, with the maximal observed concentration considered to have 100% activity.

(TIF)

S3 Fig. Histological slice of *O. porcinus* tick bite. (A) Tick bite at 1 h pi, black star showing the tick bite, an arrow indicating the haemorrhagic area. (B) Tick bite 48 h pi with arrows showing extensive haemorrhagic area and dermis lesions. Staining: Hemacolor kit (Merck Millipore, Darmstadt, Germany)

(TIF)

S4 Fig. Effect of a tick bite and intradermal inoculation at 1 h pi in pig skin with SWC3/SC172 cell labelling. (A) Tick bite. (B) Intradermal inoculation. Two types of tissue lesion were observed. The first was characterized by an area delimited by tissue disruption, collagen disruption and more abundant SWC3/CD172 cell labelling than in healthy tissue (yellow arrows). The second was sometimes observed inside the first, consisting of more intensive damage with more abundant haemorrhage and SWC3/CD172 cell labelling (red arrows). Most of the TICK biopsies presented both areas. However, statistical model analyses were only performed on the disrupted area indicated in the photo by the yellow arrows. Biopsies in the samples with tick bites were performed to a depth of 550,0 μm ($n = 14$ biopsies on 7 pigs), unlike the inoculated biopsies which were performed to a depth of $1052.8 \pm 511.4 \mu\text{m}$ ($n = 23$ biopsies on 14 pigs). (TIF)

S5 Fig. Histological slice of parotid lymph node, inoculation side, at 48 h pi. (A) Parotid lymph node from inoculation side for pigs receiving a high ASFV dose and tick salivary gland extract. (B) Parotid lymph node from inoculation side for pigs receiving a high ASFV dose alone. Merging of histological slice labelled in red with S100-Ab (IgG1, interdigitating dendritic cells, Clone SH-B1, Sigma) [18] and in green with SWC3-Ab. (TIF)

Acknowledgments

The authors are grateful to André Keranflec'h and Jean-Marie Guionnet for animal care and sampling at ANSES. The authors are grateful to Dr Nadia Amenna-Bernard from Laboccea 22 for advice and expertise in the analysis of biopsy lesions; Chantal Ripoll from the histology platform of INM-RHEM, Montpellier, for advice and histology protocols; Frédéric Stachurski from CIRAD, Montpellier, for tick sampling and breeding in Madagascar, Vincent Michaud from CIRAD, Montpellier, for virus production and helpful discussions on virology, and John Kerr (Coup de Puce Expansion) for revising the English text. The authors thank the Direction de la Santé Animale et du Phytosanitaire—Ministère de l'agriculture de l'élevage et de la pêche, Antananarivo, Madagascar for their permission to use the Madagascar isolate in this study.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MFLP JB LV. Performed the experiments: JB EH FP LV MFLP. Analyzed the data: JB RL PH VRL V MFLP. Contributed reagents/materials/analysis tools: LV EH FP TR JB MFLP. Wrote the paper: JB LV MFLP RL.

References

1. Wikel SK, Alarcon-Chaidez FJ (2001) Progress toward molecular characterization of ectoparasite modulation of host immunity. *Veterinary parasitology* 101: 275–287. PMID: [11707302](#)
2. Sonenshine DE, Roe RM (2013) *Biology of ticks*: Oxford University Press.
3. Frischknecht F (2007) The skin as interface in the transmission of arthropod-borne pathogens. *Cell Microbiol* 9: 1630–1640. PMID: [17490407](#)
4. Brossard M, Wikel SK (1997) Immunology of interactions between ticks and hosts. *Med Vet Entomol* 11: 270–276. PMID: [9330259](#)
5. Owen JA, Punt J, Stranford SA, Jones PP (2013) *Immunology* 7th edition: WH Freeman and Company, New York.
6. Francischetti IM, Sa-Nunes A, Mans BJ, Santos IM, Ribeiro JM (2009) The role of saliva in tick feeding. *Front Biosci* 14: 2051–2088.
7. Nuttall PA, Labuda M (2004) Tick-host interactions: saliva-activated transmission. *Parasitology* 129 Suppl: S177–189. PMID: [15938511](#)

8. Dixon LK, Chapman DA, Netherton CL, Upton C (2013) African swine fever virus replication and genomics. *Virus Res* 173: 3–14. doi: [10.1016/j.virusres.2012.10.020](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.10.020) PMID: [23142553](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23142553/)
9. Penrith ML, Vosloo W (2009) Review of African swine fever: transmission, spread and control. *J S Afr Vet Assoc* 80: 58–62. PMID: [19831264](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19831264/)
10. Costard S, Mur L, Lubroth J, Sanchez-Vizcaino JM, Pfeiffer DU (2013) Epidemiology of African swine fever virus. *Virus Res* 173: 191–197. doi: [10.1016/j.virusres.2012.10.030](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.10.030) PMID: [23123296](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23123296/)
11. Kleiboeker SB, Scoles GA (2001) Pathogenesis of African swine fever virus in *Ornithodoros* ticks. *Anim Health Res Rev* 2: 121–128. PMID: [11831434](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11831434/)
12. Vial L (2009) Biological and ecological characteristics of soft ticks (Ixodida: Argasidae) and their impact for predicting tick and associated disease distribution. *Parasite-Journal De La Societe Francaise De Parasitologie* 16: 191–202.
13. Gomez-Villamandos JC, Bautista MJ, Sanchez-Cordon PJ, Carrasco L (2013) Pathology of African swine fever: The role of monocyte-macrophage. *Virus Res* 173: 140–149. doi: [10.1016/j.virusres.2013.01.017](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.01.017) PMID: [23376310](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23376310/)
14. Gomez del Moral M, Ortuno E, Fernandez-Zapatero P, Alonso F, Alonso C, Ezquerro A, et al. (1999) African swine fever virus infection induces tumor necrosis factor alpha production: implications in pathogenesis. *J Virol* 73: 2173–2180. PMID: [9971800](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9971800/)
15. Salguero FJ, Ruiz-Villamor E, Bautista MJ, Sanchez-Cordon PJ, Carrasco L, Gomez-Villamandos JC (2002) Changes in macrophages in spleen and lymph nodes during acute African swine fever: expression of cytokines. *Vet Immunol Immunopathol* 90: 11–22. PMID: [12406651](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12406651/)
16. Nestle FO, Di Meglio P, Qin JZ, Nickoloff BJ (2009) Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol* 9: 679–691. doi: [10.1038/nri2622](https://doi.org/10.1038/nri2622) PMID: [19763149](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19763149/)
17. Shaw TJ, Martin P (2009) Wound repair at a glance. *J Cell Sci* 122: 3209–3213. doi: [10.1242/jcs.031187](https://doi.org/10.1242/jcs.031187) PMID: [19726630](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19726630/)
18. Gregg DA, Mebus CA, Schlafer DH (1995) Early infection of interdigitating dendritic cells in the pig lymph node with African swine fever viruses of high and low virulence: immunohistochemical and ultrastructural studies. *J Vet Diagn Invest* 7: 23–30. PMID: [7779960](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7779960/)
19. Astigarraga A, Oleaga-Perez A, Perez-Sanchez R, Baranda JA, Encinas-Grandes A (1997) Host immune response evasion strategies in *Ornithodoros erraticus* and *O. moubata* and their relationship to the development of an antiargasid vaccine. *Parasite Immunol* 19: 401–410. PMID: [9347516](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9347516/)
20. Ribeiro JM, Endris TM, Endris R (1991) Saliva of the soft tick, *Ornithodoros moubata*, contains anti-platelet and apyrase activities. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 100: 109–112. PMID: [1682082](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1682082/)
21. Titus RG, Bishop JV, Mejia JS (2006) The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. *Parasite Immunol* 28: 131–141. PMID: [16542315](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16542315/)
22. Wikel S (2013) Ticks and tick-borne pathogens at the cutaneous interface: host defenses, tick counter-measures, and a suitable environment for pathogen establishment. *Front Microbiol* 4: 337. doi: [10.3389/fmicb.2013.00337](https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00337) PMID: [24312085](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24312085/)
23. Skalova A, Iezzi G, Ampenberger F, Kopf M, Kopecky J (2008) Tick saliva inhibits dendritic cell migration, maturation, and function while promoting development of Th2 responses. *J Immunol* 180: 6186–6192. PMID: [18424740](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18424740/)
24. Gregg DA, Schlafer DH, Mebus CA (1995) African swine fever virus infection of skin-derived dendritic cells in vitro causes interference with subsequent foot-and-mouth disease virus infection. *J Vet Diagn Invest* 7: 44–51. PMID: [7779963](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7779963/)
25. Michaud V, Randriamparany T, Albina E (2013) Comprehensive phylogenetic reconstructions of African swine fever virus: proposal for a new classification and molecular dating of the virus. *PLoS One* 8: e69662. doi: [10.1371/journal.pone.0069662](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069662) PMID: [23936068](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23936068/)
26. Ravaomanana J, Michaud V, Jori F, Andriatsimahavandy A, Roger F, Albina E, et al. (2010) First detection of African swine fever virus in *Ornithodoros porcinus* in Madagascar and new insights into tick distribution and taxonomy. *Parasit Vectors* 3.
27. Kleiboeker SB, Burrage TG, Scoles GA, Fish D, Rock DL (1998) African swine fever virus infection in the argasid host, *Ornithodoros porcinus porcinus*. *Journal of Virology* 72: 1711–1724. PMID: [9499019](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9499019/)
28. Plowright W, Perry CT, Peirce MA, Parker J (1970) Experimental infection of the argasid tick, *Ornithodoros moubata porcinus*, with African swine fever virus. *Arch Gesamte Virusforsch* 31: 33–50. PMID: [5475061](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5475061/)
29. Schwan EV, Hutton D, Shields KJ, Townson S (1991) Artificial feeding and successful reproduction in *Ornithodoros moubata moubata* (Murray, 1877) (Acarina: Argasidae). *Exp Appl Acarol* 13: 107–115. PMID: [1786742](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1786742/)

30. King K, Chapman D, Argilagué JM, Fishbourne E, Hutet E, Cariolet R, et al. (2011) Protection of European domestic pigs from virulent African isolates of African swine fever virus by experimental immunisation. *Vaccine* 29: 4593–4600. doi: [10.1016/j.vaccine.2011.04.052](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.04.052) PMID: [21549789](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21549789/)
31. OIE (2012) African swine fever. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Seventh Edition ed. pp. 1067–1079.
32. Tignon M, Gallardo C, Iscaro C, Hutet E, Van der Stede Y, Kolbasov D, et al. (2011) Development and inter-laboratory validation study of an improved new real-time PCR assay with internal control for detection and laboratory diagnosis of African swine fever virus. *J Virol Methods* 178: 161–170. doi: [10.1016/j.jviromet.2011.09.007](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.09.007) PMID: [21946285](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21946285/)
33. Jamin A, Gorin S, Le Potier MF, Kuntz-Simon G (2006) Characterization of conventional and plasmacytoid dendritic cells in swine secondary lymphoid organs and blood. *Vet Immunol Immunopathol* 114: 224–237. PMID: [16978709](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16978709/)
34. Pinheiro J, Bates D (2006) Mixed-effects models in S and S-PLUS: Springer Science & Business Media.
35. Hurvich CM, Tsai C-L (1995) Model selection for extended quasi-likelihood models in small samples. *Biometrics*: 1077–1084. PMID: [7548692](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7548692/)
36. Burnham KP, Anderson DR (2002) Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach: Springer-Verlag.
37. Goldstein H (1999) Multilevel statistical models: Arnold Publishers.
38. Venables W, Ripley B (2002) Modern Applied Statistics Using S. Springer, New York, NY, USA. pp. 495.
39. Davison AC, Hinkley DV (1997) Bootstrap methods and their application: Cambridge university press.
40. Mans BJ, Andersen JF, Francischetti IM, Valenzuela JG, Schwan TG, Pham VM, et al. (2008) Comparative sialomics between hard and soft ticks: implications for the evolution of blood-feeding behavior. *Insect Biochem Mol Biol* 38: 42–58. PMID: [18070664](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18070664/)
41. Blome S, Gabriel C, Beer M (2013) Pathogenesis of African swine fever in domestic pigs and European wild boar. *Virus Res* 173: 122–130. doi: [10.1016/j.virusres.2012.10.026](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.10.026) PMID: [23137735](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23137735/)
42. Galindo-Cardiel I, Ballester M, Solanes D, Nofrarias M, Lopez-Soria S, Argilagué JM, et al. (2013) Standardization of pathological investigations in the framework of experimental ASFV infections. *Virus Res* 173: 180–190. doi: [10.1016/j.virusres.2012.12.018](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.12.018) PMID: [23313935](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23313935/)
43. Howey EB, O'Donnell V, de Carvalho Ferreira HC, Borca MV, Arzt J (2013) Pathogenesis of highly virulent African swine fever virus in domestic pigs exposed via intraoropharyngeal, intranasopharyngeal, and intramuscular inoculation, and by direct contact with infected pigs. *Virus research* 178: 328–339. doi: [10.1016/j.virusres.2013.09.024](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.09.024) PMID: [24076499](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24076499/)
44. Guinat C, Reis A, Netherton CL, Goatley L, Pfeiffer DU, Dixon L, et al. (2014) Dynamics of African swine fever virus shedding and excretion in domestic pigs infected by intramuscular inoculation and contact transmission. *Vet Res* 45: 93. doi: [10.1186/s13567-014-0093-8](https://doi.org/10.1186/s13567-014-0093-8) PMID: [25256695](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25256695/)
45. de Carvalho Ferreira HC, Backer JA, Weesendorp E, Klinkenberg D, Stegeman JA, et al. (2013) Transmission rate of African swine fever virus under experimental conditions. *Vet Microbiol* 165: 296–304. doi: [10.1016/j.vetmic.2013.03.026](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.03.026) PMID: [23664069](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23664069/)
46. Alonso C, Galindo I, Cuesta-Geijo MA, Cabezas M, Hernaez B, Munoz-Moreno R, et al. (2013) African swine fever virus-cell interactions: From virus entry to cell survival. *Virus Res* 173: 42–57. doi: [10.1016/j.virusres.2012.12.006](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.12.006) PMID: [23262167](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23262167/)
47. Sanchez EG, Quintas A, Nogal M, Castello A, Revilla Y (2013) African swine fever virus controls the host transcription and cellular machinery of protein synthesis. *Virus Res* 173: 58–75. doi: [10.1016/j.virusres.2012.10.025](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.10.025) PMID: [23154157](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23154157/)
48. Rutherford MS, Witsell A, Schook LB (1993) Mechanisms generating functionally heterogeneous macrophages: chaos revisited. *J Leukoc Biol* 53: 602–618. PMID: [8501399](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8501399/)
49. Piriou-Guzylack L, Salmon H (2008) Membrane markers of the immune cells in swine: an update. *Vet Res* 39: 54. doi: [10.1051/vetres:2008030](https://doi.org/10.1051/vetres:2008030) PMID: [18638439](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18638439/)
50. Ezquerro A, Revilla C, Alvarez B, Perez C, Alonso F, Dominguez J (2009) Porcine myelomonocytic markers and cell populations. *Dev Comp Immunol* 33: 284–298. doi: [10.1016/j.dci.2008.06.002](https://doi.org/10.1016/j.dci.2008.06.002) PMID: [18586052](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18586052/)
51. Barclay AN (2009) Signal regulatory protein alpha (SIRPα)/CD47 interaction and function. *Curr Opin Immunol* 21: 47–52. doi: [10.1016/j.coi.2009.01.008](https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.01.008) PMID: [19223164](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19223164/)
52. Kong XN, Yan HX, Chen L, Dong LW, Yang W, Liu Q, et al. (2007) LPS-induced down-regulation of signal regulatory protein α contributes to innate immune activation in macrophages. *J Exp Med* 204: 2719–2731. PMID: [17954568](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17954568/)

53. Salguero FJ, Sanchez-Cordon PJ, Nunez A, Fernandez de Marco M, Gomez-Villamandos JC (2005) Proinflammatory cytokines induce lymphocyte apoptosis in acute African swine fever infection. *J Comp Pathol* 132: 289–302. PMID: [15893987](#)
54. Chmelar J, Calvo E, Pedra JH, Francischetti IM, Kotsyfakis M (2012) Tick salivary secretion as a source of antihemostatics. *J Proteomics* 75: 3842–3854. doi: [10.1016/j.jprot.2012.04.026](#) PMID: [22564820](#)
55. Epaulard O, Adam L, Poux C, Zurawski G, Salabert N, Rosenbaum P, et al. (2014) Macrophage- and neutrophil-derived TNF- α instructs skin langerhans cells to prime antiviral immune responses. *J Immunol* 193: 2416–2426. doi: [10.4049/jimmunol.1303339](#) PMID: [25057007](#)
56. Oliveira CJ, Cavassani KA, More DD, Garlet GP, Aliberti JC, Silva JS, et al. (2008) Tick saliva inhibits the chemotactic function of MIP-1 α and selectively impairs chemotaxis of immature dendritic cells by down-regulating cell-surface CCR5. *Int J Parasitol* 38: 705–716. PMID: [18023445](#)
57. Theis JH, Budwiser PD (1974) *Rhipicephalus sanguineus*: sequential histopathology at the host-arthropod interface. *Exp Parasitol* 36: 77–105. PMID: [4846421](#)
58. Johnston CM, Brown SJ (1985) Cutaneous and systemic cellular responses induced by the feeding of the argasid tick *Ornithodoros parkeri*. *Int J Parasitol* 15: 621–628. PMID: [4093235](#)
59. McLaren DJ, Worms MJ, Brown SJ, Askenase PW (1983) *Ornithodoros tartakovskyi*: quantitation and ultrastructure of cutaneous basophil responses in the guinea pig. *Exp Parasitol* 56: 153–168. PMID: [6617800](#)
60. Brossard M, Wikel SK (2004) Tick immunobiology. *Parasitology* 129 Suppl: S161–176. PMID: [15940820](#)
61. Fontaine A, Diouf I, Bakkali N, Misse D, Pages F, Fusai T, et al. (2011) Implication of haematophagous arthropod salivary proteins in host-vector interactions. *Parasit Vectors* 4: 187. doi: [10.1186/1756-3305-4-187](#) PMID: [21951834](#)
62. Kramer CD, Poole NM, Coons LB, Cole JA (2011) Tick saliva regulates migration, phagocytosis, and gene expression in the macrophage-like cell line, IC-21. *Exp Parasitol* 127: 665–671. doi: [10.1016/j.exppara.2010.11.012](#) PMID: [21145320](#)
63. Briant L, Despres P, Choumet V, Misse D (2014) Role of skin immune cells on the host susceptibility to mosquito-borne viruses. *Virology* 464–465: 26–32. doi: [10.1016/j.virol.2014.06.023](#) PMID: [25043586](#)
64. Marquet F, Bonneau M, Pascale F, Urien C, Kang C, Schwartz-Cornil I, et al. (2011) Characterization of dendritic cells subpopulations in skin and afferent lymph in the swine model. *PLoS One* 6: e16320. doi: [10.1371/journal.pone.0016320](#) PMID: [21298011](#)
65. Allen JR, Khalil HM, Wikel SK (1979) Langerhans cells trap tick salivary gland antigens in tick-resistant guinea pigs. *J Immunol* 122: 563–565. PMID: [153930](#)
66. Nithiuthai S, Allen JR (1984) Significant changes in epidermal Langerhans cells of guinea-pigs infested with ticks (*Dermacentor andersoni*). *Immunology* 51: 133–141. PMID: [6228517](#)
67. Nithiuthai S, Allen JR (1985) Langerhans cells present tick antigens to lymph node cells from tick-sensitized guinea-pigs. *Immunology* 55: 157–163. PMID: [3997201](#)
68. Mason LM, Veerman CC, Geijtenbeek TB, Hovius JW (2014) Menage a trois: *Borrelia*, dendritic cells, and tick saliva interactions. *Trends Parasitol* 30: 95–103. doi: [10.1016/j.pt.2013.12.003](#) PMID: [24388562](#)
69. Xu Q, Seemanapalli SV, Reif KE, Brown CR, Liang FT (2007) Increasing the recruitment of neutrophils to the site of infection dramatically attenuates *Borrelia burgdorferi* infectivity. *J Immunol* 178: 5109–5115. PMID: [17404293](#)
70. Barratt-Due A, Thorgersen EB, Egge K, Pischke S, Sokolov A, Hellerud BC, et al. (2013) Combined inhibition of complement C5 and CD14 markedly attenuates inflammation, thrombogenicity, and hemodynamic changes in porcine sepsis. *J Immunol* 191: 819–827. doi: [10.4049/jimmunol.1201909](#) PMID: [23761634](#)
71. Barratt-Due A, Thorgersen EB, Lindstad JK, Pharo A, Lissina O, Lambris JD, et al. (2011) *Ornithodoros moubata* complement inhibitor is an equally effective C5 inhibitor in pigs and humans. *The Journal of Immunology* 187: 4913–4919. doi: [10.4049/jimmunol.1101000](#) PMID: [21964028](#)
72. Riek R, Lavoipierre M (1954) Reactions of the skin of laboratory animals to the bites of argasid ticks. *Royal Soc Tropical Medicine* pp. 8–9.

**B. Vector competence of Ornithodoros ticks for African swine fever virus:
a systematic review of published evaluations.**

Auteur: Jennifer Bernard¹, Jérémy Bouyer², Fernando Boinas³, Laurence Vial²

¹ Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Unité Virologie et Immunologie Porcines,
Zoopôle Les Croix, BP53, 22440 Ploufragan, France

² CIRAD BIOS, UMR15 CIRAD/INRA "Contrôle des Maladies Animales Exotiques et
Emergentes". Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier cedex 5 - France

² FMV-Ulissboa, Centre of Interdisciplinary Research in Animal Health, Lisboa, Portugal

En préparation

Annexe 8 : Valorisations orales et posters

Présentations orales :

- The 8 th Annual EPIZONE Meeting "Primed for tomorrow" 23- 25 September 2014 in Copenhagen, Denmark Hosted by DTU Vet

Effect of salivary gland extract of tick *Ornithodoros porcinus* on African swine fever virus infection in pigs

Jennifer BERNARD^{1,2}, Evelyn HUTET¹, Mireille LE DIMNA¹, Laurence VIAL²,
Marie-Frédérique LE POTIER¹

¹ Anses, Unité Virologie Immunologie Porcines, Laboratoire de Ploufragan/Plouzané - BP53, 22440 Ploufragan, France.

² UMR15 CIRAD/INRA « Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Emergentes » Campus International de Baillarguet - 34398 Montpellier, France.

African swine fever (ASF) is a lethal, hemorrhagic disease of domestic pigs for which animal slaughtering and area zoning for restricting risky movements are the only control methods available. ASF is historically endemic in eastern and southern Africa and has been introduced a few years ago into Caucasus to recently spread to Eastern Europe.

Several studies have been conducted on the role of *Ornithodoros* ticks in ASFV vector transmission to pigs during blood feeding. However, no study has investigated this peculiar interaction during tick bite, especially the role of tick saliva on the success of pig contamination. The pharmacological arsenal of tick saliva is known, mainly in hard ticks and their related pathogens, to modulate inflammatory and immune mechanisms deployed by vertebrate hosts during blood feeding. This phenomenon is suspected to exist between ASFV and soft tick.

A first one-month study was initiated on the impact of salivary gland extract of *Ornithodoros porcinus domesticus* on the virus infection and the local recruitment of myeloid cells in pigs. We compared the effect of tick bite with intradermal injection of ASFV and intradermal injection of virus added to salivary gland extract on clinical signs, immunological modifications and virus detection in pigs. Cell recruitment at injection site or biting site was also analyzed by immunohistological antibody labelling of cryosections, 1h and 48h post inoculation. Preliminary results indicate a significative lag in virological detection on the injection side parotid lymphnode in group of pig with salivary gland extract.

This study should show that gland salivary extract of tick tends to modulate innate immune response of pigs, as it has been shown for some other tick-borne diseases. The analyses of cell recruitment, notably of macrophage cells, are in progress and could indicate what is its incidence on the infection.

- Full Consortium ASForce Meeting, 22 - 24 Septembre 2015 in Lisbon, Portugal, hosted by FMV-ULisboa

Title: Is *Ornithodoros erraticus* able to transmit the Georgia 2007/1 African Swine Fever virus isolate to domestic pigs?

Authors: Bernard Jennifer^{1*} & Vial Laurence^{2*}, Hutet Evelyne¹, Paboeuf Frédérique¹,
Michaud Vincent², Boinas Fernando³, Le Potier Marie-Frédérique¹.

¹ Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Unité Virologie et Immunologie Porcines, Zoopôle Les Croix, BP53, 22440 Ploufragan, France

² CIRAD BIOS, UMR15 CIRAD/INRA "Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Emergentes". Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier cedex 5, France

³ FVM, Lisboa, Portugal

* : equal contribution

- Full Consortium ASForce Meeting, 21-24 Octobre 2014 in Montpellier, France, hosted by CIRAD

Title: Effect of salivary gland extract of tick *Ornithodoros porcinus* on African swine fever infection in pigs

Authors: Jennifer Bernard¹, Evelyne Hutet¹, Mireille Le Dimna¹, Laurence Vial², Marie-Frédérique Le Potier¹

¹ Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Unité Virologie et Immunologie Porcines, Zoopôle Les Croix, BP53, 22440 Ploufragan, France

² CIRAD BIOS, UMR15 CIRAD/INRA "Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Emergentes". Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier cedex 5, France

- Réseau Ecologie des Interactions Durables, 10-13 Février 2014 à Montpellier

Titre: Influence de la salive de tique *Ornithodoros* et de l'inoculation intradermique du virus de la Peste porcine africaine sur le recrutement cellulaire local chez le porc.

Auteurs: Jennifer Bernard¹, Evelyne Hutet², Laurence Vial¹, Marie-Frédérique Le Potier²

¹ CIRAD BIOS, UMR15 CIRAD/INRA "Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Emergentes". Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier cedex 5, France

² Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Unité Virologie et Immunologie Porcines, Zoopôle Les Croix, BP53, 22440 Ploufragan, France

- Projet Management Team ASForce Meeting, 21-22 Octobre 2013 in Madrid, Spain, hosted by UCM, Facultad de Medicina Veterinaria in Madrid

Title: Effect of salivary gland extract of tick *Ornithodoros porcinus* on African swine fever virus infection in pigs

Authors: Jennifer Bernard¹, Evelyne Hutet², Mireille Le Dimna², Laurence Vial¹, Marie-Frédérique Le Potier²

¹ CIRAD BIOS, UMR15 CIRAD/INRA "Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Emergentes". Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier cedex 5, France

² Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Unité Virologie et Immunologie Porcines, Zoopôle Les Croix, BP53, 22440 Ploufragan, France

- Training on “capture of soft ticks” in ASForce project, 3-7 June 2013, Tbilisi, Georgia

Title: Theoretical presentations on soft ticks and African Swine Fever (ASF).

1. Epidemiology of ASF and spread of the disease
2. Tick breeding technique
3. Examination and identification of specimens of the CIRAD collection

Authors: Jennifer Bernard¹, Stachurski Frédéric¹, Laurence Vial¹

¹ CIRAD BIOS, UMR15 CIRAD/INRA "Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Emergentes". Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier cedex 5, France

- Printemps de Baillarguet, 29 Mai 2012, Montpellier, France

Titre: Déterminants de la compétence vectorielle des tiques ornithodores pour le virus de la Peste Porcine Africaine : étude des stress environnementaux et effet de la salive de tique

Auteurs: Jennifer Bernard¹, Laurence Vial¹

¹ CIRAD BIOS, UMR15 CIRAD/INRA "Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Emergentes". Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier cedex 5, France

- Réunion annuel du groupe francophone Tique et maladie à Tique, 16-17
Octobre 2011, France

Titre: Compétence vectorielle des tiques ornithodores pour le virus de la Peste Porcine Africaine - effets potentiels des stress environnementaux sur la transmission

Auteurs: Jennifer Bernard¹, Laurence Vial¹

¹ CIRAD BIOS, UMR15 CIRAD/INRA "Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Emergentes". Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier cedex 5, France

Posters :

-The 10th International Conference of ESVV 2015, 'Changing viruses in a Changing world' and 9th Annual Meeting EPIZONE, 31 August – 3 September 2015.

Is *Ornithodoros erraticus* able to transmit the Georgia2007/1 African Swine Fever virus isolate to domestic pigs?

Jennifer Bernard ¹, Laurence Vial ², Evelyne Hutet ¹, Frédéric Paboeuf ¹, Vincent Michaud ², Fernando Boínas ³, Marie-Frédérique Le Potier ¹

¹: Laboratoire de Ploufragan - Plouzané (ANSES), Anses BP 53, 22440 Ploufragan - France

²: CIRAD/INRA UMR CMAEE, F-34398 Montpellier - France

³: Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa (FMVUTL), Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa - Portugal

Objective: African swine fever, one of the most devastating diseases affecting wild and domestic swine, is due to a large DNA virus, only member of the *Asfarviridae* family. After ASF introduction in Georgia in 2007, the disease became endemic in the Caucasian region of the Russian Federation and spread towards the Western regions of Europe entering in EU Member States at the beginning of 2014. As no vaccine or antiviral are available to fight against this infection, the only tools to control it are preventive measures based on early detection and actual knowledge of the epidemiological risks. In African sub-Saharan countries, ASF persistence is described to be related to different and complex epidemiological scenarios involving domestic and wild suids and soft tick vectors of the genus *Ornithodoros*. In EU, one species of *Ornithodoros*, *O. erraticus*, is known to be able to maintain and/or transmit some ASFV isolates classified in the genotype I. Recently, the Pirbright Institute also demonstrated that *O. erraticus* was able to amplify the Georgia2007/1 ASFV (genotype II), at least during 3 months. The objective of the current study was to evaluate the in-vitro and in-vivo transmissibility of the Georgia 2007/1 ASFV by infected *O. erraticus* ticks.

Methods: The Georgia 2007/1 ASFV strain belonging to the genotype II, kindly provided by L. Dixon (OIE reference lab), was grown on porcine pulmonary alveolar macrophages to the titre of 10^6 to 10^7 HAD₅₀, then diluted 100-fold into pig blood for tick infection or 1000-fold in medium for intradermal inoculation to pigs.

Ticks were captured in Portugal by F. Boinas and mass reared at CIRAD for one year and a half to obtain a stable and mature population. During this period, several techniques of artificial feeding were tested to optimize the method. In December 2014, 60 adults or last nymphal stages -group A- coming both from field and 1st generation laboratory were artificially engorged on pig blood supplemented with Georgia 2007/1 at a final titre of $10^{4.5}$ HAD₅₀/mL blood. Two other groups of ASFV-free ticks -group B with 60 individuals and group C with 30 individuals- were reared to be used for a second infection directly on infected pigs (group B) and as control group (group C), respectively. Moreover to confirm the possibility to infect ticks through artificial blood meal, another group of 10 ticks was also engorged and tested for virus multiplication three months later. Fifteen other females were also infected and secondarily engorged on ASFV-free pig blood to test in-vitro transmission through virus isolation on second blood meal. Considering that it is difficult to obtain ASFV titres with in-vitro cultivation as high as in infected pigs developing ASFV clinical signs, it seems important to compare ASFV transmissibility between ticks artificially infected in laboratory and ticks directly infected on ASFV-infected pigs and conclude on possible dose effect. In March 2015, 18 Large-White pigs obtained from a high sanitary level field herd were distributed to 4 groups at Anses-Ploufragan high security facilities. Two negative control groups of 3 pigs were either intra-dermally inoculated with MEM or bitten by group C of 30 healthy ticks. One group of 6 pigs was intra-dermally inoculated with 10^3 HAD₅₀ ASFV while the last group of 6 pigs was bitten by group A of 60 ticks previously infected through artificial blood meal and dispatched in 10 ticks/pig. Pops of 10 ticks were placed on one ear held there with adhesive tape, then removed after 3 hours. After removal, ticks were numbered in two batches: engorged and unengorged ticks. Finally, as soon as the 6 pigs intra-dermally inoculated with ASFV showed fever and high viraemia, group B of 60 ASFV-free ticks were proposed to engorge on their opposite ear. These ticks would be proposed to secondarily engorge on membrane feeding or healthy pigs three months later.

Post tick feeding or intradermal inoculation, clinical examination and rectal temperatures were recorded daily, until the animals were euthanized or for a minimum period of 18 days. Except on D1 pi, serum and EDTA blood samples were daily collected from all the pigs during the first week pi, then twice a week during the 2 following weeks, and at the day of euthanasia for virological and serological assays. Organ samples were collected during necropsy. The animal experiment protocol was approved by the French national ethics committee ComEth Anses/ENVA/UPEC (10/03/15-9).

Results: Ten ticks from the original batch of ticks that were artificially fed on infectious blood were tested by virus titration. Out of them, 8 were positive with a titre ranging from 10^2 to $10^{4.2}$ HAD₅₀/tick and 2 ticks clearly amplified the virus regarding the estimated amount of virus originally ingested (minimum of 1 log superior). After feeding on pigs, the mean level of engorged ticks was of 62%, whatever the group of pigs.

The experiment, currently running, confirmed the high virulence of the Georgia strain as all the 6 intra-dermally inoculated pigs displayed typical symptoms of ASF including loss of appetite and hyperthermia from D3 pi. The 6 pigs were euthanized from D5 to D7. The group of the 6 pigs bitten by the infected ticks was still healthy at 18 days post feeding, as well as the two negative control groups. However, among the 15 female ticks secondarily

engorged on ASFV-free pig blood, no haemadsorption effect was observed after two passages on alveolar macrophage culture using blood-meal leftovers. Further investigations are needed to confirm the presence of ASF Virus. The final experimental infection of pigs through tick bite using ticks previously engorged on viremic pigs should allow concluding on the ability of *O. erraticus* to transmit Georgia2007/1 and a possible dose effect on this transmissibility. The results will be presented and discussed during the symposium.

Conclusion: The objective of this study was to experimentally assess the ability of the European *O. erraticus* tick to transmit the Georgia 2007/1 ASFV currently circulating in North-Eastern EU. First results showed that ticks artificially infected in laboratory did not induce ASF clinical signs in pigs by biting. However, virus titration in ticks seems to show that the virus is present in the arthropod. Further in-vitro and in-vivo investigations are running to explore the hypothesis of a dose effect. The expected results should clarify the potential epidemiological role of *O. erraticus* ticks in transmission and re-emergence of ASFV in the field, in case of the spread of current active foci from North-Eastern EU.

Acknowledgements: The authors are grateful to Gerald Le Digher and Yann Bailly for animal care and sampling in ANSES. They also thank Frédéric Stachurski for his occasional assistance in tick rearing and Noël Richard and Thierry Maccotta for animal care in CIRAD to provide blood for tick feeding. The research leading to these results has received funding from the European Union Seventh Framework Programme under grant agreement n° 311931 (ASFORCE) and Conseil Général des Côtes d'Armor.

- The 12th Biennial Conference of the Society for Tropical Veterinary Medicine (STVM) and the VIII International Conference on Ticks and Tick-borne Pathogens (TTP-8), 24 August - 29 August 2014 in Cap Town South Africa

0235

Effect of salivary gland extract of tick *Ornithodoros porcinus* on African swine fever virus infection in pigs

Jennifer Bernard^{1,2}, Evelyne Hutet², Mireille Le Dimna², Jérémy Bouyer¹, Laurence Vial¹, Marie-Frédérique Le Potier²

¹CIRAD, Montpellier, France, ²Anses, Ploufragan, France

Objectives

African Swine Fever is a lethal, hemorrhagic disease of domestic pigs for which animal slaughtering and quarantine are the only control methods available. ASF is historically endemic in Africa and has been recently introduced into Europe. Studies showed the role of *Ornithodoros* ticks in ASFV vector transmission to pigs during blood feeding. However, no study has investigated this interaction during tick bite, especially the role of tick saliva on pig contamination. The pharmacological arsenal of tick saliva is known to modulate inflammatory and immune mechanisms deployed by hosts and it is suspected that such phenomenon exists between ASFV and the soft tick.

Method

A first one-month study was initiated on the impact of salivary gland extracts of *Ornithodoros porcinus domesticus* on the virus infection and the local recruitment of myeloid cells in pigs. We compared the effect of tick bite with intradermal injection of ASFV and intradermal injection of virus added to salivary gland extract on clinical signs, immunological modifications and virus detection in pigs. Cell recruitment at injection site or biting site was also analyzed by immunohistological antibody labelling of cryosections, 1h and 48h post inoculation. Preliminary results indicate a lag in temperature and virological analysis in the group with salivary gland extracts.

Conclusions

This study should showed that gland salivary extracts of ticks tend to modulate innate immune response of pigs, as it has been shown for some other tick-borne diseases. The analyses of cell recruitment, notably of macrophage cells, are in progress and could indicate what the incidence of infection is.

- La Journée des docs et post-docs de l'Anses le 28 et 29 novembre 2013

BERNARD Jennifer

Doctorante en 2^{ème} année

Financement Anses/Cirad

Laboratoire de Ploufragan/Plouzané

Unité Virologie et Immunologie Porcine

*Influence de la salive de tique *Ornithodores* et de l'inoculation intradermique du virus de la peste porcine africaine sur le recrutement cellulaire local chez le porc*

Mots-clés : Peste porcine Africaine, *Ornithodores porcinus*, recrutement cellulaire

Le virus de la Peste porcine africaine (PPA), très contagieux et résistant dans l'environnement, est à l'origine d'une des maladies hémorragiques les plus graves affectant les porcs domestiques.

La transmission vectorielle du virus au porc se produit lorsque la tique prend un repas sanguin sur son hôte. Bien que non démontré pour le cas de la PPA et des tiques ornithodores, différentes études ont établi l'utilité de l'arsenal pharmacologique que possède la salive de tique pour faire face aux mécanismes inflammatoires et immunitaires déployés par l'hôte vertébré lors du gorgement. La salive va donc jouer un rôle d'immunomodulateur et modifier potentiellement la réaction de l'hôte à l'infection.

Ainsi, une première étude a été lancée sur l'impact de la salive de tique *Ornithodores porcinus domesticus* sur le recrutement cellulaire local des cellules myéloïdes chez des porcs domestiques. Cette étude devrait nous permettre de savoir si la tique tend à favoriser l'infection du porc par le virus de la PPA, comme cela a été mis en évidence pour d'autres maladies à tiques. Par un marquage anticorps en immunofluorescence sur des cryocoupes, nous comparons l'effet de la morsure de tique, de l'injection intradermique virus de la PPA et de l'injection intradermique de virus additionné de glandes salivaires.

Cryocoupe d'une morsure de tique, coloré à l'aide du kit Hemacolor® (Merk).



Bibliographie

- Ader, D. B., C. Celluzzi, J. Bisbing, L. Gilmore, V. Gunther, K. K. Peachman, M. Rao, D. Barvir, W. Sun and D. R. Palmer, 2004: Modulation of dengue virus infection of dendritic cells by *Aedes aegypti* saliva. *Viral immunology*, **17**, 252-265.
- Adkin, A., H. Coburn, T. England, S. Hall, E. Hartnett, C. Marooney, M. Wooldridge, E. Watson, J. Cooper and T. Cox, 2004: Risk assessment for the illegal import of contaminated meat and meat products into Great Britain and the subsequent exposure of GB livestock (IIRA): foot and mouth disease (FMD), classical swine fever (CSF), African swine fever (ASF), swine vesicular disease (SVD). *African swine fever (ASF), swine vesicular disease (SVD) Veterinary Laboratories Agency, New Haw*.
- Afonso, C. L., M. E. Piccone, K. M. Zaffuto, J. Neilan, G. F. Kutish, Z. Lu, C. A. Balinsky, T. R. Gibb, T. J. Bean, L. Zsak and D. L. Rock, 2004: African swine fever virus multigene family 360 and 530 genes affect host interferon response. *Journal of virology*, **78**, 1858-1864.
- Alberdi, M. P., M. J. Dalby, J. Rodriguez-Andres, J. K. Fazakerley, A. Kohl and L. Bell-Sakyi, 2012: Detection and identification of putative bacterial endosymbionts and endogenous viruses in tick cell lines. *Ticks and tick-borne diseases*, **3**, 137-146.
- Allan, S. A., 2010: 15. Chemical ecology of tick-host interactions. *Olfaction in Vector-host Interactions*, **2**, 327.
- Allan, S. A., 2013: Tick rearing and in vitro feeding. *Biology of Ticks*, **2**, 445.
- Allen JR, Khalil HM, Wikel SK (1979) Langerhans cells trap tick salivary gland antigens in tick-resistant guinea pigs. *J Immunol* 122: 563-565.
- Almeida, A. P., A. Marcili, R. C. Leite, F. A. Nieri-Bastos, L. N. Domingues, J. R. Martins and M. B. Labruna, 2012: *Coxiella* symbiont in the tick *Ornithodoros rostratus* (Acari: Argasidae). *Ticks and tick-borne diseases*, **3**, 203-206.
- Alonso, C., I. Galindo, M. A. Cuesta-Geijo, M. Cabezas, B. Hernaez and R. Munoz-Moreno, 2013: African swine fever virus-cell interactions: From virus entry to cell survival. *Virus Res*, **173**, 42-57.
- Anderson, E. C., G. H. Hutchings, N. Mukarati and P. J. Wilkinson, 1998: African swine fever virus infection of the bushpig (*Potamochoerus porcus*) and its significance in the epidemiology of the disease. *Veterinary microbiology*, **62**, 1-15.
- Anderson, J. and J. Valenzuela, 2008: Tick saliva: from pharmacology and biochemistry to transcriptome analysis and functional genomics. *Ticks: biology, disease and control*, 92-107.
- Andrade, B. B., C. R. Teixeira, A. Barral and M. Barral-Netto, 2005: Haematophagous arthropod saliva and host defense system: a tale of tear and blood. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, **77**, 665-693.
- Andres, G., R. Garcia-Escudero, M. L. Salas and J. M. Rodriguez, 2002: Repression of African swine fever virus polyprotein pp220-encoding gene leads to the assembly of icosahedral core-less particles. *Journal of virology*, **76**, 2654-2666.
- Anguita, J., N. Ramamoorthi, J. W. Hovius, S. Das, V. Thomas, R. Persinski, D. Conze, P. W. Askenase, M. Rincon, F. S. Kantor and E. Fikrig, 2002: Salp15, an *Ixodes scapularis* salivary protein, inhibits CD4(+) T cell activation. *Immunity*, **16**, 849-859.
- Angulo, A., E. Vinuela and A. Alcamí, 1992: Comparison of the sequence of the gene encoding African swine fever virus attachment protein p12 from field virus isolates and viruses passaged in tissue culture. *Journal of virology*, **66**, 3869-3872.
- Arias, M., J. M. Sánchez-Vizcaíno, A. Morilla, K. J. Yoon and J. J. Zimmerman, 2002: African swine fever. *Trends in emerging viral infections of swine*, 119-124.

- Astigarraga, A., A. Oleaga-Perez, R. Perez-Sanchez, J. A. Baranda and A. Encinas-Grandes, 1997: Host immune response evasion strategies in *Ornithodoros erraticus* and *O. moubata* and their relationship to the development of an antiargasid vaccine. *Parasite immunology*, **19**, 401-410.
- Barclay AN (2009) Signal regulatory protein alpha (SIRP α)/CD47 interaction and function. *Curr Opin Immunol* 21: 47-52.
- Barratt-Due, A., E. B. Thorgersen, J. K. Lindstad, A. Pharo, O. Lissina, J. D. Lambris, M. A. Nunn and T. E. Mollnes, 2011: *Ornithodoros moubata* complement inhibitor is an equally effective C5 inhibitor in pigs and humans. *The Journal of Immunology*, **187**, 4913-4919.
- Barratt-Due A, Thorgersen EB, Egge K, Pischke S, Sokolov A, *et al.* (2013) Combined inhibition of complement C5 and CD14 markedly attenuates inflammation, thrombogenicity, and hemodynamic changes in porcine sepsis. *J Immunol* 191: 819-827.
- Basto, A. P., R. J. Nix, F. Boinas, S. Mencles, M. J. Silva, C. Cartaxeiro, R. S. Portugal, A. Leitao, L. K. Dixon and C. Martins, 2006a: Kinetics of African swine fever virus infection in *Ornithodoros erraticus* ticks. *Journal of General Virology*, **87**, 1863-1871.
- Basto, A. P., R. S. Portugal, R. J. Nix, C. Cartaxeiro, F. Boinas, L. K. Dixon, A. Leitao and C. Martins, 2006b: Development of a nested PCR and its internal control for the detection of African swine fever virus (ASFV) in *Ornithodoros erraticus*. *Archives of virology*, **151**, 819-826.
- Bastos, A. D., M. L. Penrith, C. Cruciere, J. L. Edrich, G. Hutchings, F. Roger, E. Couacy-Hymann and R. T. G, 2003: Genotyping field strains of African swine fever virus by partial p72 gene characterisation. *Archives of virology*, **148**, 693-706.
- Bautista, E. M., D. Gregg and W. T. Golde, 2002: Characterization and functional analysis of skin-derived dendritic cells from swine without a requirement for in vitro propagation. *Veterinary immunology and immunopathology*, **88**, 131-148.
- Beltran Alcrudo, D., J. Lubroth, K. Depner and S. De La Rocque, 2008: African swine fever in the Caucasus. *Empress watch*, 1-8.
- Ben-Yakir, D., R. Galun, 1993: Comparative study of two argasid tick species: feeding response to phagostimulants. *Israel Journal of Zoology*, 39, 2.
- Bernard, Q., B. Jaulhac, N. Boulanger, 2014: Smuggling across the border: how arthropod-borne pathogens evade and exploit the host defense system of the skin. *J Invest Dermatol*, 134(5):1211-9.
- Bernard, J., E. Hutet, F. Paboeuf, T. Randiramparany, P. Holzmuller, R. Lancelot, V. Rodrigues, L. Vial and M. F. Le Potier, 2016: Effect of *O. porcinus* tick salivary gland extract on the African swine fever virus infection in domestic pig. *PloS one*, **2** e0147869.
- Blome, S., C. Gabriel and M. Beer, 2013: Pathogenesis of African swine fever in domestic pigs and European wild boar. *Virus Res*, **173**, 122-130.
- Boinas, F. J. S., 1994: The role of *Ornithodoros erraticus* in the epidemiology of African swine fever in Portugal. University of Reading.
- Boinas, F. S., A. J. Wilson, G. H. Hutchings, C. Martins and L. J. Dixon, 2011: The persistence of African swine fever virus in field-infected *Ornithodoros erraticus* during the ASF endemic period in Portugal. *PloS one*, **6**.
- Boitani, L., L. Mattei, D. Nonis and F. Corsi, 1994: Spatial and activity patterns of wild boars in Tuscany, Italy. *Journal of Mammalogy*, **75**, 600-612.
- Borca, M. V., C. Carrillo, L. Zsak, W. W. Laegreid, G. F. Kutish, J. G. Neilan, T. G. Burrage and D. L. Rock, 1998: Deletion of a CD2-like gene, 8-DR, from African swine fever virus affects viral infection in domestic swine. *Journal of virology*, **72**, 2881-2889.
- Briant L, Despres P, Choumet V, Misse D (2014) Role of skin immune cells on the host susceptibility to mosquito-borne viruses. *Virology* 464-465: 26-32.

- Brookes, S. M., L. K. Dixon and R. M. Parkhouse, 1996: Assembly of African Swine fever virus: quantitative ultrastructural analysis in vitro and in vivo. *Virology*, **224**, 84-92.
- Brossard M, Wikel SK (1997) Immunology of interactions between ticks and hosts. *Med Vet Entomol* 11: 270-276.
- Brossard, M. and S. K. Wikel, 2004: Tick immunobiology. *Parasitology*, **129 Suppl**, S161-176.
- Buchmann, K., 2014: Evolution of Innate Immunity: Clues from Invertebrates via Fish to Mammals. *Frontiers in immunology*, **5**, 459.
- Burgdorfer, W., 1960: Colorado tick fever. II. The behavior of Colorado tick fever virus in rodents. *The Journal of infectious diseases*, **107**, 384-388.
- Burgdorfer, W. and G. R. Varma, 1967: Trans-stadial and transovarial development of disease agents in arthropods. *Annual review of entomology*, **12**, 347-376.
- Burnham KP, Anderson DR (2002) Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach: Springer-Verlag.
- Burrage, T. G., 2013: African swine fever virus infection in *Ornithodoros* ticks. *Virus Res*, **173**, 131-139.
- Burrage, T. G., Z. Lu, J. G. Neilan, D. L. Rock and L. Zsak, 2004: African swine fever virus multigene family 360 genes affect virus replication and generalization of infection in *Ornithodoros porcinus* ticks. *Journal of virology*, **78**, 2445-2453.
- Carpintero, R., C. Alonso, M. Pineiro, M. Iturralde, M. Andres, M. F. Le Potier, F. Madec, M. A. Alava, A. Pineiro and F. Lampreave, 2007: Pig major acute-phase protein and apolipoprotein A-I responses correlate with the clinical course of experimentally induced African Swine Fever and Aujeszky's disease. *Veterinary research*, **38**, 741-753.
- Carrasco, L., A. Fernandez, J. Gómez-Villamandos, E. Mozos, A. Mendez and A. Jover, 1992: Kupffer cells and PLMs in acute experimental African Swine Fever.
- Cavalcante, R. R., M. H. Pereira and N. F. Gontijo, 2003: Anti-complement activity in the saliva of phlebotomine sand flies and other haematophagous insects. *Parasitology*, **127**, 87-93.
- Cavassani, K. A., J. C. Aliberti, A. R. Dias, J. S. Silva and B. R. Ferreira, 2005: Tick saliva inhibits differentiation, maturation and function of murine bone-marrow-derived dendritic cells. *Immunology*, **114**, 235-245.
- Chakravorty, S. and T. N. Williams, 2015: Sickle cell disease: a neglected chronic disease of increasing global health importance. *Archives of disease in childhood*, **100**, 48-53.
- Champagne, D. E., 1994: The role of salivary vasodilators in bloodfeeding and parasite transmission. *Parasitology today*, **10**, 430-433.
- Chmelar, J., E. Calvo, J. H. Pedra, I. M. Francischetti and M. Kotsyfakis, 2012: Tick salivary secretion as a source of antihemostatics. *Journal of proteomics*, **75**, 3842-3854.
- CISA-INIA, 2014a: Results obtained in the xii interlaboratory comparison test for african swine fever 2015 (asf-ilct 2015) by l'anses laboratoire de ploufragan (france).
- CISA-INIA, 2014b: Standard operation procedure for the detection of african swine fever virus (asfv) by real-time polymerase chain reaction (pcr) using universal probe library (upl).
- Combes, C., 1995: *Interactions durables: Ecologie et évolution du parasitisme*, p. 524. Paris: Masson.
- Connat, J. L., 1991: Demonstration of regurgitation of gut content during blood meals of the tick *Ornithodoros moubata*. Possible role in the transmission of pathogenic agents. *Parasitol Res*, **77**, 452-454.
- Cooper, J., I. J. Gordon and A. W. Pike, 2000: Strategies for the avoidance of faeces by grazing sheep. *Applied animal behaviour science*, **69**, 15-33.

- Costard, S., B. Wieland, W. de Glanville, F. Jori, R. Rowlands, W. Vosloo, F. Roger, D. U. Pfeiffer and L. K. Dixon, 2009: African swine fever: how can global spread be prevented? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **364**, 2683-2696.
- Costard S, Mur L, Lubroth J, Sanchez-Vizcaino JM, Pfeiffer DU (2013) Epidemiology of African swine fever virus. *Virus Res* 173: 191-197.
- Crompton, P. D., J. Moebius, S. Portugal, M. Waisberg, G. Hart, L. S. Garver, L. H. Miller, C. Barillas-Mury and S. K. Pierce, 2014: Malaria immunity in man and mosquito: insights into unsolved mysteries of a deadly infectious disease. *Annual review of immunology*, **32**, 157-187.
- Dale, C. and S. Welburn, 2001: The endosymbionts of tsetse flies: manipulating host-parasite interactions. *International journal for parasitology*, **31**, 628-631.
- Davis, E. L., J. F. Butler, R. H. Roberts, J. F. Reinert and D. L. Kline, 1983: Laboratory blood feeding of *Culicoides mississippiensis* (Diptera: Ceratopogonidae) through a reinforced silicone membrane. *J. Med. Entomol*, **20**, 177-182.
- Davison AC, Hinkley DV (1997) Bootstrap methods and their application: Cambridge university press.
- de Carvalho Ferreira HC, Backer JA, Weesendorp E, Klinkenberg D, Stegeman JA, *et al.* (2013) Transmission rate of African swine fever virus under experimental conditions. *Vet Microbiol* 165: 296-304.
- de Carvalho Ferreira, H. C., S. Tudela Zúquete, M. Wijnveld, E. Weesendorp, F. Jongejan, A. Stegeman and W. L. Loeffen, 2014: No evidence of African swine fever virus replication in hard ticks. *Ticks and tick-borne diseases*, **5**, 582-589.
- Dersch, R., M. H. Freitag, S. Schmidt, H. Sommer, G. Rucker, S. Rauer and J. J. Meerpohl, 2014: Efficacy and safety of pharmacological treatments for neuroborreliosis—protocol for a systematic review. *Systematic reviews*, **3**, 117.
- Detray, D. E., 1963: African Swine Fever. *Advances in veterinary science*, **8**, 299-333.
- Diaz-Martin, V., R. Manzano-Roman, P. Obolo-Mvoulouga, A. Oleaga and R. Perez-Sanchez, 2015: Development of vaccines against *Ornithodoros* soft ticks: An update. *Ticks and tick-borne diseases*, **6**, 211-220.
- Diaz-Martin, V., R. Manzano-Roman, A. Oleaga, A. Encinas-Grandes and R. Perez-Sanchez, 2013: Cloning and characterization of a plasminogen-binding enolase from the saliva of the argasid tick *Ornithodoros moubata*. *Vet Parasitol*, **191**, 301-314.
- Diaz-Martin, V., R. Manzano-Roman, M. Siles-Lucas, A. Oleaga and R. Perez-Sanchez, 2011: Cloning, characterization and diagnostic performance of the salivary lipocalin protein TSGP1 from *Ornithodoros moubata*. *Veterinary Parasitology*, **178**, 163-172.
- Diaz, A. V., C. L. Netherton, L. K. Dixon and A. J. Wilson, 2012: African swine fever virus strain Georgia 2007/1 in *Ornithodoros erraticus* ticks. *Emerg Infect Dis*, **18**, 1026-1028.
- Dixon, L. K., C. C. Abrams, G. Bowick, L. C. Goatley, P. C. Kay-Jackson, D. Chapman, E. Liverani, R. Nix, R. Silk and F. Zhang, 2004: African swine fever virus proteins involved in evading host defence systems. *Veterinary immunology and immunopathology*, **100**, 117-134.
- Dixon, L. K., D. A. Chapman, C. L. Netherton and C. Upton, 2013: African swine fever virus replication and genomics. *Virus Res*, **173**, 3-14.
- Dye, C., 1992: The analysis of parasite transmission by bloodsucking insects. *Annual review of entomology*, **37**, 1-19.
- Eberhard, W. G., 2000: Spider manipulation by a wasp larva. *Nature*, **406**, 255-256.
- EFSA, 2014: Scientific Opinion on African Swine Fever Update, EFSA Panel on Animal Health and Welfare. EFSA journal

- el Shoura, S. M., 1987: Effect of temperature and relative humidity on the life cycle of *Ornithodoros (Pavlovskyella) erraticus* (Ixodoidea: Argasidae). *The Journal of parasitology*, **73**, 1102-1108.
- Endris, R. G., T. M. Haslett, G. Geering, W. R. Hess and M. J. Monahan, 1987: A hemolymph test for the detection of African swine fever virus in *Ornithodoros coriaceus* (Acari: Argasidae). *Journal of Medical Entomology*, **24**, 192-197.
- Endris, R. G., T. M. Haslett and W. R. Hess, 1991: Experimental transmission of African swine fever virus by the tick *Ornithodoros (Alectorobius) puertoricensis* (Acari, Argasidae). *Journal of Medical Entomology*, **28**, 854-858.
- Endris, R. G., T. M. Haslett and W. R. Hess, 1992a: African swine fever virus-infection in the soft tick, *Ornithodoros (Alectorobius) puertoricensis* (Acari, Argasidae). *Journal of Medical Entomology*, **29**, 990-994.
- Endris, R. G. and W. R. Hess, 1992: Experimental transmission of African swine fever virus by the soft tick *Ornithodoros (Pavlovskyella) maroccanus* (Acari, Ixodoidea, Argasidae). *Journal of Medical Entomology*, **29**, 652-656.
- Endris, R. G. and W. R. Hess, 1994: Attempted transovarial and venereal transmission of African swine fever virus by the Iberian soft tick *Ornithodoros (Pavlovskyella) maroccanus* (Acari: Ixodoidea: Argasidae). *Journal of Medical Entomology*, **31**, 373-381.
- Endris, R. G., W. R. Hess and J. M. Caiado, 1992b: African swine fever virus infection in the Iberian soft tick, *Ornithodoros (Pavlovskyella) maroccanus* (Acari: Argasidae). *Journal of Medical Entomology*, **29**, 874-878.
- Epaulard O, Adam L, Poux C, Zurawski G, Salabert N, *et al.* (2014) Macrophage- and neutrophil-derived TNF-alpha instructs skin langerhans cells to prime antiviral immune responses. *J Immunol* 193: 2416-2426.
- Espada-Murao LA, Morita K (2011) Dengue and soluble mediators of the innate immune system. *Trop Med Health* 39: 53-62.
- Ezquerro A, Revilla C, Alvarez B, Perez C, Alonso F, *et al.* (2009) Porcine myelomonocytic markers and cell populations. *Dev Comp Immunol* 33: 284-298.
- Fano, C., 2015: Methodes de detection et de quantification du virus de la peste porcine africaine chez la tique *O. erraticus*: mises au point et application à des tiques infectees experimentalement.
- Feldman-Muhsam, B., 1967a: Fecundity and viability of sperm cells of *Ornithodoros* ticks. *Wiad Parazytol*, **13**, 539-542.
- Feldman-Muhsam, B., 1967b: Spermatophore formation and sperm transfer in *Ornithodoros* ticks. *Science*, **156**, 1252-1253.
- Ferdy, J. B. and B. Godelle, 2005: Diversification of transmission modes and the evolution of mutualism. *The American naturalist*, **166**, 613-627.
- Fernandez-Pinero, J., C. Gallardo, M. Elizalde, A. Robles, C. Gomez, R. Bishop, L. Heath, E. Couacy-Hymann, F. O. Fasina, V. Pelayo, A. Soler and M. Arias, 2012: Molecular diagnosis of African swine fever by a new real-time PCR using universal probe library. *Transboundary and emerging diseases*.
- Fernandez, A., J. Perez, L. Carrasco, M. A. Sierra, M. Sanchez-Vizcaino and A. Jover, 1992: Detection of African swine fever viral antigens in paraffin-embedded tissues by use of immunohistologic methods and polyclonal antibodies. *American journal of veterinary research*, **53**, 1462-1467.
- Fokunang, C. N., A. G. O. Dixon and T. Ikotun, 2004: Effect of temperature on the survival and infectivity of *Pseudotheraptus devastans* vector. *Mycopathologia*, **158**, 385-392.

- Fontaine, A., I. Diouf, N. Bakkali, D. Misse, F. Pages, T. Fusai, C. Rogier and L. Almeras, 2011: Implication of haematophagous arthropod salivary proteins in host-vector interactions. *Parasites & vectors*, **4**, 187.
- Fourie, J. J., D. Stanneck, H. G. Luus, F. Beugnet, M. Wijnveld and F. Jongejan, 2013: Transmission of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* ticks feeding on dogs and on artificial membranes. *Vet Parasitol*, **197**, 595-603.
- Frances, S. P., P. Watcharapichat, D. Phulsuksombati and P. Tanskul, 2000: Transmission of *Orientia tsutsugamushi*, the aetiological agent for scrub typhus, to co-feeding mites. *Parasitology*, **120** (Pt 6), 601-607.
- Francischetti, I. M., B. J. Mans, Z. Meng, N. Gudderra, T. D. Veenstra, V. M. Pham and J. M. Ribeiro, 2008: An insight into the sialome of the soft tick, *Ornithodoros parkeri*. *Insect Biochem Mol Biol*, **38**, 1-21.
- Francischetti, I. M., A. Sa-Nunes, B. J. Mans, I. M. Santos and J. M. Ribeiro, 2009: The role of saliva in tick feeding. *Front Biosci*, **14**, 2051-2088.
- Franz, A. W., A. M. Kantor, A. L. Passarelli and R. J. Clem, 2015: Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes. *Viruses*, **7**, 3741-3767.
- Frischknecht F (2007) The skin as interface in the transmission of arthropod-borne pathogens. *Cell Microbiol* 9: 1630-1640.
- Fu, H., C. J. Leake, P. P. Mertens and P. S. Mellor, 1999: The barriers to bluetongue virus infection, dissemination and transmission in the vector, *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae). *Archives of virology*, **144**, 747-761.
- Gale, P., T. Drew, L. P. Phipps, G. David and M. Wooldridge, 2009: The effect of climate change on the occurrence and prevalence of livestock diseases in Great Britain: a review. *Journal of Applied Microbiology*, **106**, 1409-1423.
- Galindo-Cardiel, I., M. Ballester, D. Solanes, M. Nofrarias, S. Lopez-Soria, J. M. Argilaguet, A. Lacasta, F. Accensi, F. Rodriguez and J. Segales, 2013: Standardization of pathological investigations in the framework of experimental ASFV infections. *Virus Res*, **173**, 180-190.
- Gallardo, C., A. Soler, R. Nieto, C. Cano, V. Pelayo, M. A. Sanchez, G. Pridotkas, J. Fernandez-Pinero, V. Briones and M. Arias, 2015: Experimental Infection of Domestic Pigs with African Swine Fever Virus Lithuania 2014 Genotype II Field Isolate. *Transboundary and emerging diseases*.
- Galun, R. and S. Kindler, 1968: Chemical basis of feeding in the tick *Ornithodoros tholozani*. *Journal of Insect Physiology*, **14**, 1409-1421.
- Garaud, J. C. and G. Roussel, 2004: Immunohistochimie en microscopie photonique et électronique. *Théorie et pratique*.
- Gérardin, A., 2008: Contribution à l'étude de certaines impasses parasitaires chez l'homme.
- Gern, L. and O. Rais, 1996: Efficient transmission of *Borrelia burgdorferi* between cofeeding *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol*. 33(1):189-92.
- Gillespie, R. D., M. L. Mbow and R. G. Titus, 2000: The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. *Parasite immunology*, **22**, 319-331.
- Gillespie, S. H., G. L. Smith and A. Osbourn, 2004: Microbe-vector interactions in vector-borne diseases. Cambridge University Press.
- Goldstein H (1999) Multilevel statistical models: Arnold Publishers.
- Gomez-Puertas, P., F. Rodriguez, J. M. Oviedo, F. Ramiro-Ibanez, F. Ruiz-Gonzalvo, C. Alonso and J. M. Escribano, 1996: Neutralizing antibodies to different proteins of African swine fever virus inhibit both virus attachment and internalization. *Journal of virology*, **70**, 5689-5694.
- Gomez-Villamandos, J. C., M. J. Bautista, P. J. Sanchez-Cordon and L. Carrasco, 2013: Pathology of African swine fever: The role of monocyte-macrophage. *Virus Res*, **173**, 140-149.

- Gomez del Moral, M., E. Ortuno, P. Fernandez-Zapatero, F. Alonso, C. Alonso, A. Ezquerro and J. Dominguez, 1999: African swine fever virus infection induces tumor necrosis factor alpha production: implications in pathogenesis. *Journal of virology*, **73**, 2173-2180.
- Gonzaga, M. O. and J. F. Sobczak, 2007: Parasitoid-induced mortality of *Araneus omnicolor* (Araneae, Araneidae) by *Hymenoepimecis* sp. (Hymenoptera, Ichneumonidae) in southeastern Brazil. *Die Naturwissenschaften*, **94**, 223-227.
- Gooding, R. H., 1996: Genetic variation in arthropod vectors of disease-causing organisms: obstacles and opportunities. *Clinical microbiology reviews*, **9**, 301-320.
- Gregg, D. A., C. A. Mebus and D. H. Schlafer, 1995: Early infection of interdigitating dendritic cells in the pig lymph node with African swine fever viruses of high and low virulence: immunohistochemical and ultrastructural studies. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, **7**, 23-30.
- Gregg DA, Schlafer DH, Mebus CA (1995) African swine fever virus infection of skin-derived dendritic cells in vitro causes interference with subsequent foot-and-mouth disease virus infection. *J Vet Diagn Invest* 7: 44-51.
- Greig, A., 1972a: The localization of African swine fever virus in the tick *Ornithodoros moubata porcinus*. *Arch Gesamte Virusforsch*, **39**, 240-247.
- Greig, A., 1972b: Pathogenesis of African swine fever in pigs naturally exposed to the disease. *Journal of comparative pathology*, **82**, 73-79.
- Greig, A. and W. Plowright, 1970: The excretion of two virulent strains of African swine fever virus by domestic pigs. *J Hyg (Lond)*, **68**, 673-682.
- Groocock, C. M., W. R. Hess and W. J. Gladney, 1980: Experimental transmission of African swine fever virus by *Ornithodoros coriaceus*, an argasid tick indigenous to the United States. *American journal of veterinary research*, **41**, 591-594.
- Guglielmone, A. A., R. G. Robbins, D. A. Apanaskevich, T. N. Petney, A. Estrada-Peña, I. G. Horak, R. Shao and S. C. Barker, 2010: The *Argasidae*, *Ixodidae* and *Nuttalliellidae* (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa*, **2528**, 1-28.
- Guinat, C., A. Reis, C. L. Netherton, L. Goatley, D. U. Pfeiffer and L. Dixon, 2014: Dynamics of African swine fever virus shedding and excretion in domestic pigs infected by intramuscular inoculation and contact transmission. *Veterinary research*, **45**, 93.
- Gutiérrez, S., M. Yvon, E. Pirolles, E. Garzo, A. Fereres, Y. Michalakis and S. Blanc, 2012: Circulating virus load determines the size of bottlenecks in viral populations progressing within a host.
- Hajdusek, O., R. Sima, N. Ayllon, M. Jalovecka, J. Perner, J. de la Fuente and P. Kopacek, 2013: Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, **3**, 26.
- Hajnacka, V., N. Fuchsberger, M. Slovak, P. Kocakova, M. Labuda and P. A. Nuttall, 1998: Tick salivary gland extracts promote virus growth in vitro. *Parasitology*, **116** (Pt 6), 533-538.
- Halos, L., T. Jamal, L. Vial, R. Maillard, A. Suau, A. Le Menach, H. J. Boulouis and M. Vayssier-Taussat, 2004: Determination of an efficient and reliable method for DNA extraction from ticks. *Veterinary research*, **35**, 709-713.
- Hardy, J. L., E. J. Houk, L. D. Kramer and W. C. Reeves, 1983: Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. *Annual review of entomology*, **28**, 229-262.
- Haresnape, J. M. and P. J. Wilkinson, 1989: A study of African swine fever virus infected ticks (*Ornithodoros moubata*) collected from three villages in the ASF enzootic area of Malawi following an outbreak of the disease in domestic pigs. *Epidemiol Infect*, **102**, 507-522.

- Hart, B. L., 1990: Behavioral adaptations to pathogens and parasites: five strategies. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, **14**, 273-294.
- Hausfater, G. and B. J. Meade, 1982: Alternation of sleeping groves by yellow baboons (*Papio cynocephalus*) as a strategy for parasite avoidance. *Primates*, **23**, 287-297.
- Hegde, S., J. L. Rasgon and G. L. Hughes, 2015: The microbiome modulates arbovirus transmission in mosquitoes. *Current opinion in virology*, **15**, 97-102.
- Helluy, S. and F. Thomas, 2010: Parasitic manipulation and neuroinflammation: Evidence from the system *Microphallus papillorobustus* (Trematoda) - *Gammarus* (Crustacea). *Parasites & vectors*, **3**, 38.
- Hess, W. R., R. G. Endris, T. M. Haslett, M. J. Monahan and J. P. McCoy, 1987: Potential arthropod vectors of African swine fever virus in North America and the Caribbean basin. *Veterinary Parasitology*, **26**, 145-155.
- Hess, W. R., R. G. Endris, A. Lousa and J. M. Caiado, 1989: Clearance of African swine fever virus from infected tick (Acari) colonies. *Journal of Medical Entomology*, **26**, 314-317.
- Heuschele, W. and L. Coggins, 1965: Studies on the transmission of African swine fever virus by arthropods. *Proc. US Livestock Sanit. Ass*, **69**, 94-100.
- Heuschele, W. P. and L. Coggins, 1969: Epizootiology of African swine fever virus in warthogs. *Bull Epizoot Dis Afr*, **17**, 179-183.
- Higgs, S., S. Gillespie, G. Smith and A. Osbourn, 2004: How do mosquito vectors live with their viruses? *Microbe-vector interactions in vector-borne diseases*, 103-137.
- Hovius, J.W., M. Levi, E. Fikrig, 2008 : Salivating for knowledge: potential pharmacological agents in tick saliva. *PLoS Med*. 5(2)
- Howey, E. B., V. O'Donnell, H. C. de Carvalho Ferreira, M. V. Borca and J. Arzt, 2013: Pathogenesis of highly virulent African swine fever virus in domestic pigs exposed via intraoropharyngeal, intranasopharyngeal, and intramuscular inoculation, and by direct contact with infected pigs. *Virus research*, **178**, 328-339.
- Hurvich CM, Tsai C-L (1995) Model selection for extended quasi-likelihood models in small samples. *Biometrics*: 1077-1084.
- Jamin A, Gorin S, Le Potier MF, Kuntz-Simon G (2006) Characterization of conventional and plasmacytoid dendritic cells in swine secondary lymphoid organs and blood. *Vet Immunol Immunopathol* 114: 224-237.
- Jaworski, D. C., A. Jasinskas, C. N. Metz, R. Bucala and A. G. Barbour, 2001: Identification and characterization of a homologue of the pro-inflammatory cytokine Macrophage Migration Inhibitory Factor in the tick, *Amblyomma americanum*. *Insect molecular biology*, **10**, 323-331.
- Johnston CM, Brown SJ (1985) Cutaneous and systemic cellular responses induced by the feeding of the argasid tick *Ornithodoros parkeri*. *Int J Parasitol* 15: 621-628.
- Jones, L. D., E. Hodgson and P. A. Nuttall, 1989: Enhancement of virus transmission by tick salivary glands. *The Journal of general virology*, **70 (Pt 7)**, 1895-1898.
- Jones, L. D., E. Hodgson, T. Williams, S. Higgs and P. A. Nuttall, 1992: Saliva activated transmission (SAT) of Thogoto virus: relationship with vector potential of different haematophagous arthropods. *Medical and veterinary entomology*, **6**, 261-265.
- Jones, R. and N. Foster, 1978: Relevance of laboratory colonies of the vector in arbovirus research-*Culicoides variipennis* and bluetongue. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, **27**, 168-177.
- Jori, F. and A. D. Bastos, 2009: Role of wild suids in the epidemiology of African swine fever. *Ecohealth*, **6**, 296-310.

- Jori, F., L. Vial, M. L. Penrith, R. Perez-Sanchez, E. Etter, E. Albina, V. Michaud and F. Roger, 2013: Review of the sylvatic cycle of African swine fever in sub-Saharan Africa and the Indian ocean. *Virus Res*, **173**, 212-227.
- Jupatanakul, N., S. Sim and G. Dimopoulos, 2014: The insect microbiome modulates vector competence for arboviruses. *Viruses*, **6**, 4294-4313.
- Karalyan, Z., H. Zakaryan, K. Sargsyan, H. Voskanyan, H. Arzumanyan, H. Avagyan and E. Karalova, 2012: Interferon status and white blood cells during infection with African swine fever virus in vivo. *Veterinary immunology and immunopathology*, **145**, 551-555.
- Kärber, G., 1931: Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche [Contribution to collective treatment of pharmacological serial tests] *Arch Exp Pathol Pharmacol* 162: 480 483. German.
- Kaufman, S. E., W. R. Kaufman and J. E. Phillips, 1981: Fluid balance in the argasid tick, *Ornithodoros moubata*, fed on modified blood meals. *Journal of Experimental Biology*, **93**.
- Kaufman, S. E., W. R. Kaufman and J. E. Phillips, 1982: Mechanism and characteristics of coxal fluid excretion in the argasid tick *Ornithodoros moubata*. *Journal of Experimental Biology*, **98**, 343-352.
- Keller, P. M., L. Waxman, B. A. Arnold, L. D. Schultz, C. Condra and T. M. Connolly, 1993: Cloning of the cDNA and expression of moubatin, an inhibitor of platelet aggregation. *The Journal of biological chemistry*, **268**, 5450-5456.
- Khomenko, S., D. Beltrán-Alcrudo, A. Rozstalnyy, A. Gogin, D. Kolbasov, J. Pinto, J. Lubroth and V. Martin, 2013: African swine fever in the Russian Federation: risk factors for Europe and beyond. *Emerg Infect Dis*, **28**, 1-14.
- Kilpatrick, A. M., M. A. Meola, R. M. Moudy and L. D. Kramer, 2008: Temperature, viral genetics, and the transmission of West Nile virus by *Culex pipiens* mosquitoes. *PLoS pathogens*, **4**, e1000092.
- King, K., D. Chapman, J. M. Argilaguet, E. Fishbourne, E. Hutet, R. Cariolet, G. Hutchings, C. A. Oura, C. L. Netherton, K. Moffat, G. Taylor, M. F. Le Potier, L. K. Dixon and H. H. Takamatsu, 2011: Protection of European domestic pigs from virulent African isolates of African swine fever virus by experimental immunisation. *Vaccine*, **29**, 4593-4600.
- Kleiboeker, S. B., T. G. Burrage, G. A. Scoles, D. Fish and D. L. Rock, 1998: African swine fever virus infection in the argasid host, *Ornithodoros porcinus porcinus*. *Journal of virology*, **72**, 1711-1724.
- Kleiboeker, S. B. and G. A. Scoles, 2001: Pathogenesis of African swine fever virus in *Ornithodoros* ticks. *Anim Health Res Rev*, **2**, 121-128.
- Kleiboeker, S. B., G. A. Scoles, T. G. Burrage and J. H. Sur, 1999: African swine fever virus replication in the midgut epithelium is required for infection of *Ornithodoros* ticks. *Journal of virology*, **73**, 8587-8598.
- Kohlmeier, J. E. and D. L. Woodland, 2009: Immunity to respiratory viruses. *Annual review of immunology*, **27**, 61-82.
- Kong XN, Yan HX, Chen L, Dong LW, Yang W, *et al.* (2007) LPS-induced down-regulation of signal regulatory protein α contributes to innate immune activation in macrophages. *J Exp Med* 204: 2719-2731.
- Kopáček, P., R. Vogt, L. Jindrák, C. Weise and I. Šafařík, 1999: Purification and characterization of the lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Insect biochemistry and molecular biology*, **29**, 989-997.
- Kopecky, J. and M. Kuthejllova, 1998: Suppressive effect of *Ixodes ricinus* salivary gland extract on mechanisms of natural immunity in vitro. *Parasite immunology*, **20**, 169-174.

- Kotsyfakis, M., A. Sa-Nunes, I. M. Francischetti, T. N. Mather, J. F. Andersen and J. M. Ribeiro, 2006: Antiinflammatory and immunosuppressive activity of sialostatin L, a salivary cystatin from the tick *Ixodes scapularis*. *The Journal of biological chemistry*, **281**, 26298-26307.
- Kramer, C. D., Poole, N. M., Coons, L. B. and J.A. Cole, 2011: Tick saliva regulates migration, phagocytosis, and gene expression in the macrophage-like cell line, IC-21. *Exp Parasitol*, **127**, 665-671.
- Krober, T. and P. M. Guerin, 2007a: An in vitro feeding assay to test acaricides for control of hard ticks. *Pest management science*, **63**, 17-22.
- Krober, T. and P. M. Guerin, 2007b: In vitro feeding assays for hard ticks. *Trends in parasitology*, **23**, 445-449.
- Kupper, T. S. and R. C. Fuhlbrigge, 2004: Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nat Rev Immunol*, **4**, 211-222.
- Kuthejlova, M., J. Kopecky, G. Stepanova and A. Macela, 2001: Tick salivary gland extract inhibits killing of *Borrelia afzelii* spirochetes by mouse macrophages. *Infection and immunity*, **69**, 575-578.
- Kyckova, K. and J. Kopecky, 2006: Effect of tick saliva on mechanisms of innate immune response against *Borrelia afzelii*. *J Med Entomol*, **43**, 1208-1214.
- Labuda, M., L. D. Jones, T. Williams and P. A. Nuttall, 1993: Enhancement of tick-borne encephalitis virus transmission by tick salivary gland extracts. *Medical and veterinary entomology*, **7**, 193-196.
- Lavoipierre, M. and R. Riek, 1954: Further studies on the reactions of the skin of laboratory animals to the bites of argasid ticks. *Royal Soc Tropical Medicine*
- Lawrie, C. H., N. Y. Uzategui, E. A. Gould and P. A. Nuttall, 2004: Ixodid and argasid tick species and west nile virus. *Emerg Infect Dis*, **10**, 653-657.
- Lehane, M.J. 2005: The Biology of Blood-Sucking in Insects, Second Edition. *Cambridge University Press*, Chapter 5, p56-83
- Leitao, A., C. Cartaxeiro, R. Coelho, B. Cruz, R. M. Parkhouse, F. Portugal, J. D. Vigarrio and C. L. Martins, 2001: The non-haemadsorbing African swine fever virus isolate ASFV/NH/P68 provides a model for defining the protective anti-virus immune response. *The Journal of general virology*, **82**, 513-523.
- Libert, S., Y. Chao, X. Chu and S. D. Pletcher, 2006: Trade-offs between longevity and pathogen resistance in *Drosophila melanogaster* are mediated by NFkB signaling. *Aging cell*, **5**, 533-543.
- Lubisi, B. A., A. D. Bastos, R. M. Dwarka and W. Vosloo, 2005: Molecular epidemiology of African swine fever in East Africa. *Archives of virology*, **150**, 2439-2452.
- Ma, W. J., F. Vavre and L. W. Beukeboom, 2014: Manipulation of arthropod sex determination by endosymbionts: diversity and molecular mechanisms. *Sexual development : genetics, molecular biology, evolution, endocrinology, embryology, and pathology of sex determination and differentiation*, **8**, 59-73.
- Machain-Williams, C., K. Reagan, T. Wang, N. S. Zeidner and C. D. Blair, 2013: Immunization with *Culex tarsalis* mosquito salivary gland extract modulates West Nile virus infection and disease in mice. *Viral immunology*, **26**, 84-92.
- Malmquist, W. A. and D. Hay, 1960: Hemadsorption and cytopathic effect produced by African Swine Fever virus in swine bone marrow and buffy coat cultures. *American journal of veterinary research*, **21**, 104-108.
- Mango, C. K. and R. Galun, 1977: *Ornithodoros moubata*: breeding in vitro. *Experimental parasitology*, **42**, 282-288.

- Mans, B. J., J. F. Andersen, I. M. Francischetti, J. G. Valenzuela, T. G. Schwan, V. M. Pham, M. K. Garfield, C. H. Hammer and J. M. Ribeiro, 2008: Comparative sialomics between hard and soft ticks: implications for the evolution of blood-feeding behavior. *Insect Biochem Mol Biol*, **38**, 42-58.
- Margam, V. M., E. W. Gachomo, J. H. Shukle, O. O. Ariyo, M. J. Seufferheld and S. O. Kotchoni, 2010: A simplified arthropod genomic-DNA extraction protocol for polymerase chain reaction (PCR)-based specimen identification through barcoding. *Molecular biology reports*, **37**, 3631-3635.
- Marquet F, Bonneau M, Pascale F, Urien C, Kang C, *et al.* (2011) Characterization of dendritic cells subpopulations in skin and afferent lymph in the swine model. *PLoS One* 6: e16320.
- Martin-Acebes, M. A. and J. C. Saiz, 2012: West Nile virus: A re-emerging pathogen revisited. *World journal of virology*, **1**, 51-70.
- Mason LM, Veerman CC, Geijtenbeek TB, Hovius JW (2014) Menage a trois: *Borrelia*, dendritic cells, and tick saliva interactions. *Trends Parasitol* 30: 95-103.
- McCullough, K. C., S. Basta, S. Knotig, H. Gerber, R. Schaffner, Y. B. Kim, A. Saalmuller and A. Summerfield, 1999: Intermediate stages in monocyte-macrophage differentiation modulate phenotype and susceptibility to virus infection. *Immunology*, **98**, 203-212.
- McLaren DJ, Worms MJ, Brown SJ, Askenase PW (1983) *Ornithodoros tartakovskyi*: quantitation and ultrastructure of cutaneous basophil responses in the guinea pig. *Exp Parasitol* 56: 153-168.
- McVicar, J. W., 1984: Quantitative aspects of the transmission of African swine fever. *American journal of veterinary research*, **45**, 1535-1541.
- Mead, D. G., F. B. Ramberg, D. G. Besselsen and C. J. Mare, 2000: Transmission of vesicular stomatitis virus from infected to noninfected black flies co-feeding on nonviremic deer mice. *Science*, **287**, 485-487.
- Mebus, C., M. Arias, J. Pineda, J. Tapiador, C. House and J. Sanchez-Vizcaino, 1997: Survival of several porcine viruses in different Spanish dry-cured meat products. *Food Chemistry*, **59**, 555-559.
- Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr., 1997: Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*, **91**, 295-298.
- Mellor, P. S., R. P. Kitching and P. J. Wilkinson, 1987: Mechanical transmission of capripox virus and African swine fever virus by *Stomoxys calcitrans*. *Res Vet Sci*, **43**, 109-112.
- Mellor, P. S. and P. J. Wilkinson, 1985: Experimental transmission of African swine fever virus by *Ornithodoros savignyi* (Audouin). *Res Vet Sci*, **39**, 353-356.
- Merad, M., F. Ginhoux and M. Collin, 2008: Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat Rev Immunol*, **8**, 935-947.
- Michaud, V., 2013: Détection et caractérisation moléculaires rapides du virus de la peste porcine africaine et utilisation des reconstructions phylogénétiques pour reconstituer son histoire évolutive. *Biologie Santé*. Université Montpellier II.
- Michaud V, Randriamparany T, Albina E (2013) Comprehensive phylogenetic reconstructions of African swine fever virus: proposal for a new classification and molecular dating of the virus. *PLoS One* 8: e69662.
- Mighell, A. J., W. J. Hume and P. A. Robinson, 1998: An overview of the complexities and subtleties of immunohistochemistry. *Oral diseases*, **4**, 217-223.
- Montgomery, R. E., 1921: On a form of swine fever occurring in British East Africa (Kenya Colony). *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, **34**, 159-191.
- Morel, P. C., 2003: Ticks from Africa and the Mediterranean Basin. CD-ROM edited by Cirad.

- Mur, L., B. Martinez-Lopez, S. Costard, A. de la Torre, B. A. Jones, M. Martinez, F. Sanchez-Vizcaino, M. J. Munoz, D. U. Pfeiffer, J. M. Sanchez-Vizcaino and B. Wieland, 2014: Modular framework to assess the risk of African swine fever virus entry into the European Union. *BMC Vet Res*, **10**, 145.
- Nava, S., A. A. Guglielmone and A. J. Mangold, 2009: An overview of systematics and evolution of ticks. *Frontiers in bioscience*, **14**, 2857-2877.
- Nestle FO, Di Meglio P, Qin JZ, Nickoloff BJ (2009) Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol* 9: 679-691.
- Netherton, C. L. and T. E. Wileman, 2013: African swine fever virus organelle rearrangements. *Virus Res*, **173**, 76-86.
- Nfon, C. K., H. Dawson, F. N. Toka and W. T. Golde, 2008: Langerhans cells in porcine skin. *Veterinary immunology and immunopathology*, **126**, 236-247.
- Nienaber, J., A. R. Gaspar and A. W. Neitz, 1999: Savignin, a potent thrombin inhibitor isolated from the salivary glands of the tick *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). *Experimental parasitology*, **93**, 82-91.
- Nithiuthai S, Allen JR (1984) Significant changes in epidermal Langerhans cells of guinea-pigs infested with ticks (*Dermacentor andersoni*). *Immunology* 51: 133-141.
- Nithiuthai S, Allen JR (1985) Langerhans cells present tick antigens to lymph node cells from tick-sensitized guinea-pigs. *Immunology* 55: 157-163.
- Nix, R. J., 2006: Interaction of African swine fever virus with its tick vector. University of Surrey.
- Noda, H., U. G. Munderloh and T. J. Kurtti, 1997: Endosymbionts of ticks and their relationship to *Wolbachia* spp. and tick-borne pathogens of humans and animals. *Applied and environmental microbiology*, **63**, 3926-3932.
- Nonaka, E., G.D. Ebel, H.J. Wearing, 2010: Persistence of pathogens with short infectious periods in seasonal tick populations: the relative importance of three transmission routes. *PLoS One*. 23;5(7):e11745.
- Norley, S. G. and R. C. Wardley, 1983: Investigation of porcine natural-killer cell activity with reference to African swine-fever virus infection. *Immunology*, **49**, 593-597.
- Norsworthy, N. B., J. Sun, D. Elnaïem, G. Lanzaro and L. Soong, 2004: Sand fly saliva enhances *Leishmania amazonensis* infection by modulating interleukin-10 production. *Infection and immunity*, **72**, 1240-1247.
- Nunn, M. A., A. Sharma, G. C. Paesen, S. Adamson, O. Lissina, A. C. Willis and P. A. Nuttall, 2005: Complement inhibitor of C5 activation from the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Journal of immunology*, **174**, 2084-2091.
- Nuttall, P., M. Labuda and A. Bowman, 2008: Saliva-assisted transmission of tick-borne pathogens. *Ticks: biology, disease and control*, 205-219.
- Nuttall, P. A., 2009: Molecular characterization of tick-virus interactions. *Frontiers in bioscience*, **14**, 2466-2483.
- Nuttall, P. A., L. D. Jones, M. Labuda and W. R. Kaufman, 1994: Adaptations of arboviruses to ticks. *J Med Entomol*, **31**, 1-9.
- Nuttall, P. A. and M. Labuda, 2004: Tick-host interactions: saliva-activated transmission. *Parasitology*, **129 Suppl**, S177-189.
- OIE, 2012: African swine fever. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*.
- Oliveira, C. J., K. A. Cavassani, D. D. More, G. P. Garlet, J. C. Aliberti, J. S. Silva and B. R. Ferreira, 2008: Tick saliva inhibits the chemotactic function of MIP-1 α and selectively impairs chemotaxis of immature dendritic cells by down-regulating cell-surface CCR5. *Int J Parasitol*, **38**, 705-716.

- Osborne, R. W. and P. S. Mellor, 1985: Use of a silicone membrane feeding technique in the laboratory maintenance of a colony of *Ornithodoros moubata*. *Trop Anim Health Prod*, **17**, 31-38.
- Oura, C. A., L. Edwards and C. A. Batten, 2013: Virological diagnosis of African swine fever-Comparative study of available tests. *Virus Res*, **173**, 150-158.
- Owen, J., J. Punt and S. Stranford, 2014: *Immunologie-7e édition: Le cours de Janis Kuby avec questions de révision*. Dunod.
- Owen, J. A., J. Punt, S. A. Stranford and P. P. Jones, 2013: *Immunology 7th edition*. WH Freeman and Company, New York.
- Palta, S., R. Saroa and A. Palta, 2014: Overview of the coagulation system. *Indian journal of anaesthesia*, **58**, 515-523.
- Pechova, J., G. Stepanova, L. Kovar and J. Kopecky, 2002: Tick salivary gland extract-activated transmission of *Borrelia afzelii* spirochaetes. *Folia parasitologica*, **49**, 153-159.
- Penrith, M. L., G. R. Thomson, A. D. Bastos, O. C. Phiri, B. A. Lubisi, E. C. Du Plessis, F. Macome, F. Pinto, B. Botha and J. Esterhuysen, 2004: An investigation into natural resistance to African swine fever in domestic pigs from an endemic area in southern Africa. *Rev Sci Tech*, **23**, 965-977.
- Penrith ML, Vosloo W (2009) Review of African swine fever: transmission, spread and control. *J S Afr Vet Assoc* 80: 58-62.
- Penrith, M. L., W. Vosloo, F. Jori and A. D. Bastos, 2013: African swine fever virus eradication in Africa. *Virus Res*, **173**, 228-246.
- Perez-Nunez, D., E. Garcia-Urdiales, M. Martinez-Bonet, M. L. Nogal, S. Barroso, Y. Revilla and R. Madrid, 2015: CD2v Interacts with Adaptor Protein AP-1 during African Swine Fever Infection. *PloS one*, **10**, e0123714.
- Perez-sanchez, R., A. Astigarraga, A. Oleagaperez and A. Encinasgrandes, 1994: Relationship between the persistence of African swine fever and the distribution of *Ornithodoros erraticus* in the province of salamanca, Spain. *Veterinary Record*, **135**, 207-209.
- Perry, R. D. and J. D. Fetherston, 1997: *Yersinia pestis* - etiologic agent of plague. *Clinical microbiology reviews*, **10**, 35-66.
- Pinheiro J, Bates D (2006) Mixed-effects models in S and S-PLUS: Springer Science & Business Media.
- Piriou-Guzylack, L. and H. Salmon, 2008: Membrane markers of the immune cells in swine: an update. *Veterinary research*, **39**, 54.
- Plowright, W., 1977: *Vector transmission of African Swine Fever Virus, Brussels*.
- Plowright, W., J. Parker and M. A. Peirce, 1969a: African swine fever virus in ticks (*Ornithodoros moubata*, murray) collected from animal burrows in Tanzania. *Nature*, **221**, 1071-1073.
- Plowright, W., J. Parker and M. A. Pierce, 1969b: The epizootiology of African swine fever in Africa. *Vet Rec*, **85**, 668-674.
- Plowright, W., C. T. Perry and A. Greig, 1974: Sexual transmission of African swine fever virus in the tick, *Ornithodoros moubata porcinus*, Walton. *Res Vet Sci*, **17**, 106-113.
- Plowright, W., C. T. Perry and M. A. Peirce, 1970a: Transovarial infection with African swine fever virus in the argasid tick, *Ornithodoros moubata porcinus*, Walton. *Res Vet Sci*, **11**, 582-584.
- Plowright, W., C. T. Perry, M. A. Peirce and J. Parker, 1970b: Experimental infection of the argasid tick, *Ornithodoros moubata porcinus*, with African swine fever virus. *Arch Gesamte Virusforsch*, **31**, 33-50.

- Plowright, W., G. R. Thomson and J. A. Naser, 1994: African swine fever. In: J. A. W. Coetzer, G. R. Thomson and R. C. Tustin (eds.), *Infectious diseases of livestock, with special reference to southern Africa*. Oxford University Press.
- Preston, S. G., J. Majtan, C. Kouremenou, O. Rysnik, L. F. Burger, A. Cabezas Cruz, M. Chiong Guzman, M. A. Nunn, G. C. Paesen, P. A. Nuttall and J. M. Austyn, 2013: Novel immunomodulators from hard ticks selectively reprogramme human dendritic cell responses. *PLoS pathogens*, **9**, e1003450.
- Ramamoorthi, N., S. Narasimhan, U. Pal, F. Bao, X. F. Yang, D. Fish, J. Anguita, M. V. Norgard, F. S. Kantor, J. F. Anderson, R. A. Koski and E. Fikrig, 2005: The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. *Nature*, **436**, 573-577.
- Randolph, S. E., 2011: Transmission of tick-borne pathogens between co-feeding ticks: Milan Labuda's enduring paradigm. *Ticks and tick-borne diseases*, **2**, 179-182.
- Ravaomanana, J., F. Jori, L. Vial, R. Perez-Sanchez, E. Blanco, V. Michaud and F. Roger, 2011: Assessment of interactions between African swine fever virus, bushpigs (*Potamochoerus larvatus*), *Ornithodoros* ticks and domestic pigs in north-western Madagascar. *Transboundary and emerging diseases*, **58**, 247-254.
- Ravaomanana, J., V. Michaud, F. Jori, A. Andriatsimahavandy, F. Roger, E. Albina and L. Vial, 2010: First detection of African swine fever virus in *Ornithodoros porcinus* in Madagascar and new insights into tick distribution and taxonomy. *Parasites & vectors*, **3**.
- Reck, J., F. S. Marks, C. Termignoni, J. A. Guimaraes and J. R. Martins, 2013: *Ornithodoros brasiliensis* (mouro tick) salivary gland homogenates inhibit in vivo wound healing and in vitro endothelial cell proliferation. *Parasitol Res*, **112**, 1749-1753.
- Rennie, L., P. J. Wilkinson and P. S. Mellor, 2000: Effects of infection of the tick *Ornithodoros moubata* with African swine fever virus. *Medical and veterinary entomology*, **14**, 355-360.
- Rennie, L., P. J. Wilkinson and P. S. Mellor, 2001: Transovarial transmission of African swine fever virus in the argasid tick *Ornithodoros moubata*. *Medical and veterinary entomology*, **15**, 140-146.
- Rennie, L. F., 1998: The persistence of african swine fever virus in the argasid tick *ornithodoros moubata*. University of Hertfordshire.
- Ribeiro, J. M., T. M. Endris and R. Endris, 1991: Saliva of the soft tick, *Ornithodoros moubata*, contains anti-platelet and apyrase activities. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*, **100**, 109-112.
- Ribeiro, J. M. and I. M. Francischetti, 2003: Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annual review of entomology*, **48**, 73-88.
- Ribeiro, J. M., G. T. Makoul, J. Levine, D. R. Robinson and A. Spielman, 1985: Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. *The Journal of experimental medicine*, **161**, 332-344.
- Ribeiro, J. M., N. S. Zeidner, K. Ledin, M. C. Dolan and T. N. Mather, 2004: How much pilocarpine contaminates pilocarpine-induced tick saliva? *Medical and veterinary entomology*, **18**, 20-24.
- Ribeiro, R., J. Otte, S. Madeira, G. H. Hutchings and F. Boinas, 2015: Experimental Infection of *Ornithodoros erraticus sensu stricto* with Two Portuguese African Swine Fever Virus Strains. Study of Factors Involved in the Dynamics of Infection in Ticks. *PloS one*, **10**, e0137718.
- Riek, R. and M. Lavoipierre, 1954: Reactions of the skin of laboratory animals to the bites of argasid ticks. Royal Soc Tropical Medicine

- Rodriguez, J. M., R. Garcia-Escudero, M. L. Salas and G. Andres, 2004: African swine fever virus structural protein p54 is essential for the recruitment of envelope precursors to assembly sites. *Journal of virology*, **78**, 4299-1313.
- Rojo, G., R. Garcia-Beato, E. Vinuela, M. L. Salas and J. Salas, 1999: Replication of African swine fever virus DNA in infected cells. *Virology*, **257**, 524-536.
- Rowlands, R. J., M. M. Duarte, F. Boinas, G. Hutchings and L. K. Dixon, 2009: The CD2v protein enhances African swine fever virus replication in the tick vector, *Ornithodoros erraticus*. *Virology*, **393**, 319-328.
- Rowlands, R. J., V. Michaud, L. Heath, G. Hutchings, C. Oura, W. Vosloo, R. Dwarka, T. Onashvili, E. Albina and L. K. Dixon, 2008: African swine fever virus isolate, Georgia, 2007. *Emerg Infect Dis*, **14**, 1870-1874.
- Ruiz-Gonzalvo, F., F. Rodriguez and J. M. Escribano, 1996: Functional and immunological properties of the baculovirus-expressed hemagglutinin of African swine fever virus. *Virology*, **218**, 285-289.
- Rutherford MS, Witsell A, Schook LB (1993) Mechanisms generating functionally heterogeneous macrophages: chaos revisited. *J Leukoc Biol* 53: 602-618.
- Salguero, F. J., E. Ruiz-Villamor, M. J. Bautista, P. J. Sanchez-Cordon, L. Carrasco and J. C. Gomez-Villamandos, 2002: Changes in macrophages in spleen and lymph nodes during acute African swine fever: expression of cytokines. *Veterinary immunology and immunopathology*, **90**, 11-22.
- Salguero, F. J., P. J. Sanchez-Cordon, A. Nunez, M. Fernandez de Marco and J. C. Gomez-Villamandos, 2005: Proinflammatory cytokines induce lymphocyte apoptosis in acute African swine fever infection. *Journal of comparative pathology*, **132**, 289-302.
- Sanchez-Torres, C., P. Gomez-Puertas, M. Gomez-del-Moral, F. Alonso, J. M. Escribano, A. Ezquerro and J. Dominguez, 2003: Expression of porcine CD163 on monocytes/macrophages correlates with permissiveness to African swine fever infection. *Archives of virology*, **148**, 2307-2323.
- Sanchez, B. C. and C. Badiola, 1966: Presence of the African swine pest virus in *Haematopinus suis*. *Bulletin-Office international des épizooties*, **66**, 699.
- Sanchez Botija, C., 1963: Reservorios del virus de la peste porcina africana. Investigación del virus de la PPA en los artrópodos mediante la prueba de la hemoadsorción. *Bulletin Office International des Épizooties*, **60**, 895-899.
- Sanchez, E. G., A. Quintas, M. Nogal, A. Castello and Y. Revilla, 2013: African swine fever virus controls the host transcription and cellular machinery of protein synthesis. *Virus Res*, **173**, 58-75.
- Sato, Y. and M. Nakao, 1997: Transmission of the Lyme disease spirochete, *Borrelia garinii*, between infected and uninfected immature Ixodes persulcatus during cofeeding on mice. *The Journal of parasitology*, **83**, 547-550.
- Sawynok, J., 1998: Adenosine receptor activation and nociception. *European journal of pharmacology*, **347**, 1-11.
- Schmid-Hempel, P., 2005: Evolutionary ecology of insect immune defenses. *Annual review of entomology*, **50**, 529-551.
- Schmid-Hempel, P., 2011: *Evolutionary parasitology: the integrated study of infections, immunology, ecology, and genetics*. Oxford University Press New York.
- Schneider, B. S. and S. Higgs, 2008: The enhancement of arbovirus transmission and disease by mosquito saliva is associated with modulation of the host immune response. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **102**, 400-408.

- Schneider, B. S., L. Soong, L. L. Coffey, H. L. Stevenson, C. E. McGee and S. Higgs, 2010: *Aedes aegypti* saliva alters leukocyte recruitment and cytokine signaling by antigen-presenting cells during West Nile virus infection. *PLoS one*, **5**, e11704.
- Shaw, T. J. and P. Martin, 2009: Wound repair at a glance. *J Cell Sci*, **122**, 3209-3213.
- Skalova A, Iezzi G, Ampenberger F, Kopf M, Kopecky J (2008) Tick saliva inhibits dendritic cell migration, maturation, and function while promoting development of Th2 responses. *J Immunol* 180: 6186-6192.
- Sonenshine, D. E., 1991: *Biology of ticks. Volume 1*. Oxford University Press.
- Sonenshine, D. E., 1993: *Biology of ticks. Volume 2*. Oxford University Press.
- Sonenshine, D. E. and R. M. Roe, 2013: *Biology of ticks*. Oxford University Press.
- Tabares, E., I. Olivares, G. Santurde, M. J. Garcia, E. Martin and M. E. Carnero, 1987: African swine fever virus DNA: deletions and additions during adaptation to growth in monkey kidney cells. *Archives of virology*, **97**, 333-346.
- Takeshita, K., K. Sakai, K. B. Bacon and F. Gantner, 2003: Critical role of histamine H4 receptor in leukotriene B4 production and mast cell-dependent neutrophil recruitment induced by zymosan in vivo. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **307**, 1072-1078.
- Theis JH, Budwiser PD (1974) *Rhipicephalus sanguineus*: sequential histopathology at the host-arthropod interface. *Exp Parasitol* 36: 77-105.
- Thomas, F., K. Mete, S. Helluy, F. Santalla, O. Verneau, T. de Meeus, F. Cézilly and F. Renaud, 1997: Hitch-hiker parasites or how to benefit from the strategy of another parasite. *Evolution; international journal of organic evolution*, 1316-1318.
- Thomson, G. R., 1985: The epidemiology of African swine fever: the role of free-living hosts in Africa. *The Onderstepoort journal of veterinary research*, **52**, 201-209.
- Thomson, G. R., M. D. Gainaru, A. Lewis, H. Biggs, E. Nevill, H. Van der Pykeamp, L. Gerber, J. Esterhuysen, R. Bengis, D. Bezuidenhout and J. Condy, 1983: *The relationship between African Swine Fever Virus, the warthog and Orinithodoros species in southern Africa.*, Brussels.
- Tignon, M., C. Gallardo, C. Iscaro, E. Hutet, Y. Van der Stede, D. Kolbasov, G. M. De Mia, M. F. Le Potier, R. P. Bishop, M. Arias and F. Koenen, 2011: Development and inter-laboratory validation study of an improved new real-time PCR assay with internal control for detection and laboratory diagnosis of African swine fever virus. *J Virol Methods*, **178**, 161-170.
- Titus, R. G., J. V. Bishop and J. S. Mejia, 2006: The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. *Parasite immunology*, **28**, 131-141.
- Titus, R. G. and J. M. Ribeiro, 1988: Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance Leishmania infectivity. *Science*, **239**, 1306-1308.
- Tong, S. and W. Hu, 2001: Climate variation and incidence of Ross river virus in Cairns, Australia: a time-series analysis. *Environ Health Perspect*, **109**, 1271-1273.
- Tran, A., F. Biteau-Coroller, H. Guis and F. Roger, 2005: Modélisation des maladies vectorielles. *Epidémiol et santé anim*, **47**, 35-51.
- Turner, L., L. Shamseer, D. G. Altman, L. Weeks, J. Peters, T. Kober, S. Dias, K. F. Schulz, A. C. Plint and D. Moher, 2012: Consolidated standards of reporting trials (CONSORT) and the completeness of reporting of randomised controlled trials (RCTs) published in medical journals. *The Cochrane Library*.

- Uttenthal, A., U. C. Braae, H. A. Ngowi, T. B. Rasmussen, J. Nielsen and M. V. Johansen, 2013: ASFV in Tanzania: asymptomatic pigs harbor virus of molecular similarity to Georgia 2007. *Veterinary microbiology*, **165**, 173-176.
- Vachieri, N., C. Puech, P. Cavelier, V. Rodrigues, R. Aprelon, T. Lefrançois, D. Martinez and M. Epardaud, 2015: An in vitro model to assess the immunosuppressive effect of tick saliva on the mobilization of inflammatory monocyte-derived cells. *Veterinary research*, **46**, 1-11.
- Valenzuela, J. G., R. Charlab, T. N. Mather and J. M. Ribeiro, 2000: Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis*. *The Journal of biological chemistry*, **275**, 18717-18723.
- Vallée, I., S. W. Tait and P. P. Powell, 2001: African swine fever virus infection of porcine aortic endothelial cells leads to inhibition of inflammatory responses, activation of the thrombotic state, and apoptosis. *Journal of virology*, **75**, 10372-10382.
- van de Locht, A., M. T. Stubbs, W. Bode, T. Friedrich, C. Bollschweiler, W. Hoffken and R. Huber, 1996: The ornithodorin-thrombin crystal structure, a key to the TAP enigma? *The EMBO journal*, **15**, 6011-6017.
- van den Hurk, A. F., S. Hall-Mendelin, A. T. Pyke, G. A. Smith and J. S. Mackenzie, 2010: Vector competence of Australian mosquitoes for chikungunya virus. *Vector borne and zoonotic diseases*, **10**, 489-495.
- van Leengoed, L. A. and E. M. Kamp, 1989: A method for bronchoalveolar lavage in live pigs. *The Veterinary quarterly*, **11**, 65-72.
- Vassant, J., S. Brandt, É. Nivois and É. Baubet, 2010: Le fonctionnement des compagnies des sangliers. *Faune sauvage*, **288**, 8-13.
- Venables W, Ripley B (2002) *Modern Applied Statistics Using S*. Springer, New York, NY, USA. pp. 495.
- Vial, L., 2009: Biological and ecological characteristics of soft ticks (Ixodida: Argasidae) and their impact for predicting tick and associated disease distribution. *Parasite-Journal De La Societe Francaise De Parasitologie*, **16**, 191-202.
- Vial, L. B. Wieland, J. Ferran, E. Etter, L. Dixon, F. Roger, 2007: African Swine Fever Virus DNA in Soft Ticks, Senegal. *Emerg Infect Dis.* **13**, 1928-31.
- Wade, J. O., 1976: A new design of membrane feeder incorporating an electrical blood stirring device. *Annals of tropical medicine and parasitology*, **70**, 113-120.
- Walton, G. A., 1962: The *Ornithodoros moubata* superspecies problem in relation to human relapsing fever epidemiology., *Aspects of Disease Transmission by Ticks*. Zoological Society of London Symposium series, London.
- Walton, G. A., 1964: The *Ornithodoros "Moubata"* Group of Ticks in Africa. Control Problems and Implications. *J Med Entomol*, **1**, 53-64.
- Weaver, S. C., 2004: Vector competence. In: C. U. Press (ed.), *Microbe-vector interactions in vector-borne diseases*. Stephen H. Gillespie, Geoffrey L. Smith, Anne Osbourn
- Webb, G., 1990: Studies on the mechanical transmission of animal viruses by biting flies. Council for National Academic Awards.
- Weiss, B. and S. Aksoy, 2011: Microbiome influences on insect host vector competence. *Trends in parasitology*, **27**, 514-522.
- Wensvoort, G., C. Terpstra, J. M. Pol, E. A. ter Laak, M. Bloemraad, E. P. de Kluyver, C. Kragten, L. van Buiten, A. den Besten, F. Wagenaar and *et al.*, 1991: Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *The Veterinary quarterly*, **13**, 121-130.
- Werner, B., 2009: [Skin biopsy with histopathologic analysis: why? what for? how? part II]. *Anais brasileiros de dermatologia*, **84**, 507-513.

- Werren, J. H., L. Baldo and M. E. Clark, 2008: *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature reviews. Microbiology*, **6**, 741-751.
- Wikel, S. K., 1996: Host immunity to ticks. *Annual review of entomology*, **41**, 1-22.
- Wikel, S.K., 1999: Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission. *Int J Parasitol.* 29(6):851-9.
- Wikel SK, Alarcon-Chaidez FJ (2001) Progress toward molecular characterization of ectoparasite modulation of host immunity. *Veterinary parasitology* 101: 275-287.
- Wikel S (2013) Ticks and tick-borne pathogens at the cutaneous interface: host defenses, tick countermeasures, and a suitable environment for pathogen establishment. *Front Microbiol* 4: 337.
- Wilkinson, P. J., R. G. Pegram, B. D. Perry, J. Lemche and H. F. Schels, 1988: The distribution of African swine fever virus isolated from *Ornithodoros moubata* in Zambia. *Epidemiol Infect*, **101**, 547-564.
- Wright, G. J. and J. C. Rayner, 2014: *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion: combining function with immune evasion. *PLoS pathogens*, **10**, e1003943.
- Xu, Q., S. V. Seemanapalli, K. E. Reif, C. R. Brown and F. T. Liang, 2007: Increasing the recruitment of neutrophils to the site of infection dramatically attenuates *Borrelia burgdorferi* infectivity. *Journal of immunology*, **178**, 5109-5115.
- Yanez, R. J., J. M. Rodriguez, M. L. Nogal, L. Yuste, C. Enriquez, J. F. Rodriguez and E. Vinuela, 1995: Analysis of the complete nucleotide sequence of African swine fever virus. *Virology*, **208**, 249-278.
- Zeidner, N. S., S. Higgs, C. M. Happ, B. J. Beaty and B. R. Miller, 1999: Mosquito feeding modulates Th1 and Th2 cytokines in flavivirus susceptible mice: an effect mimicked by injection of sialokinins, but not demonstrated in flavivirus resistant mice. *Parasite immunology*, **21**, 35-44.
- Zeidner, N. S., B. S. Schneider, M. S. Nuncio, L. Gern and J. Piesman, 2002: Coinoculation of *Borrelia spp.* with tick salivary gland lysate enhances spirochete load in mice and is tick species-specific. *The Journal of parasitology*, **88**, 1276-1278.
- Zsak, L., Z. Lu, T. G. Burrage, J. G. Neilan, G. F. Kutish, D. M. Moore and D. L. Rock, 2001: African swine fever virus multigene family 360 and 530 genes are novel macrophage host range determinants. *Journal of virology*, **75**, 3066-3076.

Résumé

La peste porcine africaine (PPA) est une maladie hémorragique contagieuse dévastatrice pour l'élevage porcin pour laquelle aucun traitement ni vaccin ne sont disponibles. Cette infection est due à un virus à ADN, unique membre de la famille des Asfarviridae, qui se transmet directement entre suidés ou via un vecteur, la tique du genre *Ornithodoros*. Le rôle de ces tiques dans le cycle épidémiologique de la PPA consiste principalement à maintenir le virus dans les populations de suidés sauvages en Afrique. Elles ont aussi été identifiées à l'origine de certains cas de résurgence de la maladie dans des bâtiments d'élevage porcin, notamment dans la péninsule ibérique, lors des années 1970-80. La PPA, éradiquée fin des années 1980 en Europe (à l'exception de la Sardaigne), a été de nouveau introduite en 2007 en Géorgie pour progresser jusqu'à l'Est de l'Union Européenne. La question de la compétence vectorielle des tiques *Ornithodoros* pour le virus de la PPA et des déterminants qui influencent cette compétence est posée dans l'évaluation des risques d'endémisation et/ou de dispersion de la maladie. Le premier chapitre de cette thèse vise à caractériser la compétence vectorielle des tiques *Ornithodoros* pour le virus de la PPA et faire ressortir les patrons généraux qui la qualifient. Pour cela, a été réalisée une revue systématique des études ayant testé la compétence vectorielle d'une ou plusieurs espèces de tiques pour une ou plusieurs souches virales de PPA durant ces 50 dernières années. Au final, il en ressort une forte variabilité de résultats selon les couples tique-virus. En outre, il semble difficile de comparer ces résultats et d'établir des « profils types » du fait de l'évaluation partielle de la compétence vectorielle pour de nombreux couples tique-virus et de la diversité des méthodologies utilisées pour tester et mesurer la compétence. Pour autant chaque modalité d'étude révèle une partie des mécanismes et des adaptations auxquels sont soumis les couples tique-virus et suggère l'effet de certains déterminants dont deux sont traités dans les deux autres chapitres de la thèse. Le second chapitre de la thèse traite de l'adaptation tique-virus, par l'étude expérimentale de l'infection des tiques *O. erraticus*, *O. porcinus* et *O. moubata* à l'aide de deux souches de génotype II du virus de la PPA, et par un essai de transmission du virus des tiques aux porcs. Des souches du génotype II ont été choisies car ce génotype circule actuellement en Europe et risque d'infecter les tiques européennes *O. erraticus* s'il se propage jusqu'en péninsule ibérique. Alors qu'*O. erraticus* est capable de s'infecter et de transmettre différentes souches virales du génotype I, sa compétence à transmettre la souche Georgia2007/1 (génotype II) n'a pour l'instant pas été démontrée. Toutefois, nos études suggèrent que les résultats de compétence dépendent aussi des conditions d'expérimentation telles que la nature des colonies de tiques utilisées ou encore le titre viral utilisé pour infecter les tiques. Le dernier chapitre de la thèse porte sur l'effet de la salive de tique sur l'étape de transmission du virus de la PPA par la tique au porc. Durant le repas de sang, la salive est un élément essentiel qui va permettre l'accroche et le gorgement durable de la tique sur son hôte, avec des propriétés immunomodulatrices importantes agissant directement sur l'hôte. Ainsi a été réalisée une étude expérimentale *in vivo* faisant intervenir la tique *O. porcinus* et le virus Ambat02 (génotype II) et testant l'effet local et systémique chez le porc d'un extrait de glandes salivaires de tique co-inoculé ou non avec le virus de la PPA, versus la piqûre naturelle de tiques non infectées. Les résultats de cette expérience nous montrent que la salive de tique est capable de moduler au niveau local le recrutement de cellules immunitaires dans la peau du porc et potentiellement influencer l'infection locale chez le porc.

Abstract

African swine fever (ASF) is a contagious hemorrhagic disease with disastrous financial consequences for pig industry, as no vaccine or treatment exists. This infection is caused by a DNA virus, only member of the Asfarviridae family that can be directly transmitted between swine or by a non-compulsory vector, the *Ornithodoros* tick. *Ornithodoros* ticks play a role in the persistence of the disease within wild and domestic suids in Africa. They were also involved in resurgences of outbreaks in some pig farms in the Iberian Peninsula in 1970-1980. ASF, eradicated in Europe at the end of the 1980's except in Sardinia, was reintroduced in Georgia in 2007 then spread towards the Eastern European Union. The question of the tick vector competence for ASF virus (ASFV) and its related determinants is of importance in the risk assessment of endemisation/spread of the disease in Europe or elsewhere. The first chapter of this thesis aims to characterize *Ornithodoros* tick vector competence for ASFV and to highlight a common pattern to qualify it. For this purpose, a systematic review of the studies carried out on the vector competence of one or more tick species for one or more ASFV, was performed on the last 50 years publications. A high variability of the results obtained for different couples "tick-virus" was highlighted. As most of the papers describe partial evaluation of the vector competence and because of the high number of methods used to perform these assessments, it was definitively very difficult to compare these results, and to propose common patterns. However, each of these studies revealed a part of the mechanisms that participated to the adaptation in the couple "tick-virus", and suggested the importance of different determinants, out of them, two were experimentally assessed as described in the two other chapters. The second chapter of this thesis describes the adaptation "tick-virus" through the experimental infection of three different ticks, *O. erraticus*, *O. porcinus* and *O. moubata* by two ASFV strains belonging to the genotype II. *O. erraticus*'s competence is known for ASFV strains belonging to the genotype I but has never demonstrated the ASFV Georgia 2007/1 strain (genotype II) and currently circulating in Europe. However, the experiments we performed, suggest that many experimental conditions could influence the results obtained on vector competence as the tick colony or the virus dose used for the tick infection. The third chapter describes the effect of the tick saliva on the ASFV transmission from the tick to the pig. Tick saliva contains important immunomodulatory molecules that interfere with the pig immune system permitting complete engorgement of the tick on its host. The host-vector and pathogen interactions were studied through an *in vivo* experimentation involving pig, *O. porcinus* tick and ASFV Ambat02 strain (genotype II). The local and systemic effects on the pig immune responses were assessed with the ASFV alone or combined with tick gland extract, versus a healthy tick bite. Data analysis highlighted the tick saliva role on skin immune cell recruitment and its potential effect on local infection.